



*Facultad de Ciencias*

*Universidad Autónoma de Madrid*

***INMUNOPROTEÓMICA APLICADA A LA  
PRESENTACIÓN DE PÉPTIDOS VIRALES POR  
MOLECULAS DE MHC DE CLASE I***

*Memoria para optar al grado de Doctor en Ciencias  
presentada por*

***Susana Infantes Esteban***

***Director    Dr. Daniel López Rodríguez***

*Investigador titular ISCIII  
Centro Nacional de Microbiología*

***Tutor        Dr. Balbino De Alarcón***

*Profesor de investigación  
Centro de Biología Molecular Severo Ochoa*

*A mi hijo Mario,  
por darme cariño y fuerza*

## *DEDICATORIA*

Esta tesis está dedicada a todas aquellas personas que creen en mí.

A aquellas personas que me han acompañado en mi lucha por conseguir mis deseos.

A los que me han enseñado lo mejor que tiene esta vida.

A aquellos que me han querido y he querido.

A todos los que forman parte de mí vida, que son inmortales.

Todo mi esfuerzo, mi lucha y mi amor son para ustedes.

*¡ MUCHAS GRACIAS!*

### *Agradecimientos*

Han sido muchas las personas que han ayudado y contribuido al desarrollo de esta tesis y ahora tengo esta oportunidad para expresar mi agradecimiento de corazón.

A Daniel mi director de tesis, por haberme dado la oportunidad de llevar a cabo esta tesis. Por sus consejos y apoyo otorgado de diversas maneras. Gracias.

A Ruth, por su amistad, apoyo, trabajo y por acompañarme en los malos y los buenos momentos.

A Toñi por su apoyo y confianza en todos los momentos.

A Manolo, por ayudarme con su dedicación incondicional en mi tesis.

A Elenita, por su amistad y buen compañerismo.

Al Servicio de Proteómica del ISCIII, Mercedes y Fátima por su esfuerzo.

A los miembros del laboratorio de la Unidad de Inmunología Viral del ISCIII, Carmen, Carolina, Salva, Eva, Susana, Sara y Marga por lo que me enseñaron en los seminarios de grupo.

A mis padres, mi hermana y tíos por su ayuda con Mario.

A Dori, por su confianza en mí, su apoyo y su cariño.

A todos los que han estado en esta etapa de mi vida y para aquellos que siempre estarán a mi lado.

*"la teoría es asesinada tarde o temprano por la experiencia"*

*Albert Einstein*



*INMUNOPROTEÓMICA APLICADA A LA PRESENTACIÓN DE  
PÉPTIDOS VIRALES POR MOLÉCULAS DE MHC DE CLASE I*

*Susana Infantes Esteban*

*Enero 2011*

## Summary

In the classical MHC class I Ag presentation pathway, antigenic peptides derived from viral proteins by multiple proteolytic cleavages are transported to the endoplasmic reticulum lumen and are then exposed to aminopeptidase activity. In the current study, a long MHC class I natural ligand recognized by cytotoxic T lymphocytes was used to study the kinetics of degradation by aminopeptidase. The in vitro data indicate that a single epitope show that the H-2L<sup>d</sup> molecule protects the HIV N-extended epitope from trimming by ERAAP. This indicates that ERAAP cannot trim the H-2L<sup>d</sup> ligand when the peptide-MHC complex is fully folded. In addition, using mass spectrometry analysis of complex HLA-bound peptide pools isolated from large amounts of HRSV-infected cells, we identified an HLA-Cw4 ligand derived from human respiratory syncytial virus matrix protein that is very different from what was expected from studies with synthetic peptides. This natural HLA-Cw4 class I ligand uses alternative interactions to the anchor motifs previously described for its presenting HLA-Cw4 class I molecule. This octameric peptide shares its C-terminal core with the H-2D<sup>b</sup> nonamer ligand previously identified in the mouse model. Also, others nine naturally processed HLA-B27 ligands were identified by similar immunoproteomics approach. All isolated peptides are derived from six internal, not envelope, proteins of the infective virus. The sequences of most of these ligands are not conserved between different HRSV strains, suggesting a mechanism to explain recurrent infection with virus of different HRSV antigenic subgroups. In addition, these ligands represent a significant fraction of the proteome of this virus, which is monitored by the same HLA class I allele. These data have implications for vaccine development as well as for analysis of the CTL response.

### *Abreviaturas*

ATP	Trifosfato de Adenosina
$\beta_2m$	Beta-2-microglobulina
CTL	Linfocito T Citotóxico
Da	Dalton
DNA	Ácido Desoxiribonucleico
DRiPs	Productos Defectivos de la Síntesis Ribosomal
ERAP	Aminopeptidasa Asociada al Retículo Endoplásmico
ESI-IT	<i>Electrospray ionization-ion trap</i>
FBS	Suero Fetal Bovino
HLA	Antígenos Leucocitarios Humanos
HPLC	Cromatografía líquida de alta resolución
IE-HPLC	HPLC de intercambio iónico
IFN	Interferón
MALDI-TOF	<i>Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization Time of Flight</i>
MHC	Complejo Principal de Histocompatibilidad
MS/MS	Espectrometría de masas en Tandem
M/Z	Relación masa/carga
RE	Retículo Endoplásmico
RP-HPLC	HPLC en fase reversa
RPMI	Medio de cultivo celular “Roswell Park Memorial Institute”
TAP	Transportador asociado con el Procesamiento Antigénico
TFA	Ácido Trifluoroacético
TPPII	Tripeptidil peptidasa II
VRSH	Virus Respiratorio Sincitial Humano





## **INTRODUCCIÓN..... 13**

1.– Molécula de histocompatibilidad de clase I ( MHC-I) –.....	14
2.– Procesamiento de antígeno, formación, transporte y presentación a las moléculas de MHC de clase I –.....	16
2.1 – Origen de los péptidos antigénicos –.....	16
2.2 – Translocación de péptidos al retículo endoplásmico –.....	18
2.3– Ensamblaje y expresión de los péptidos con MHC de clase I –.....	19
3.– Aminopeptidasa del Retículo Endoplásmico asociada a procesamiento antigénico, ERAAP –.....	20
4.– Ligandos naturales de H-2 <sup>d</sup> derivados de la proteína gp160 de VIH –.....	22
5.– Virus respiratorio sincitial humano (VRSN) –.....	22
5.1 – Características del virus respiratorio sincitial humano –.....	22
5.2 – Genoma de VRSN –.....	22
5.3 – Proteínas virales –.....	23
5.4 – Respuesta inmunitaria frente a la infección por VRSN –.....	25

## **OBJETIVOS ..... 27**

## **MATERIALES Y MÉTODOS..... 29**

1.– Líneas celulares –.....	30
2.– Anticuerpos –.....	30
3.– Péptidos sintéticos –.....	30
4.– Complejos péptido-H-2L <sup>d</sup> –.....	31
5.– Digestión con la enzima recombinante ERAAP –.....	31
6.– Aislamiento de péptidos unidos a HLA –.....	31
7.– Espectrometría de masas tipo MALDI-TOF –.....	32
7. a – Espectrometría de masas tipo MALDI-TOF aplicado a las digestiones con la enzima ERAAP –.....	32
7. b – Espectrometría de masas tipo MALDI-TOF del extracto de 2x10 <sup>9</sup> células –.....	32
8.– Espectrometría de masas tipo electrospray trampa iónica –.....	32
8. a – Espectrometría de masas tipo electrospray trampa iónica aplicado a las digestiones con la enzima ERAAP –.....	32
8.b – Espectrometría de masas tipo electrospray trampa iónica del extracto de 2x10 <sup>9</sup> células –.....	33
8.c – Espectrometría de masas tipo electrospray trampa iónica del extracto de 4x10 <sup>10</sup> células –.....	33
9.– Búsqueda de homología de secuencia en base de datos –.....	33
10.– Ensayos de estabilidad del complejo MHC/péptido –.....	34
11.– Dinámica Molecular –.....	35

**RESULTADOS..... 36**

***A— La molécula de clase I, H-2Ld protege in vitro a un epítipo N-extendido del recorte por ERAAP.***

.....	37
1— ERAAP recorta eficientemente a un sustrato natural soluble —.....	37
2— La molécula H-2 L <sup>d</sup> protege a ligandos N-extendidos del recorte in vitro por parte de la aminopeptidasa ERAAP —.....	40

***B— Células HLA-Cw4 infectadas con el virus sincitial respiratorio presentan un ligando viral con interacciones a HLA no canónicas. .... 43***

1— Identificación de ligandos presentados por HLA procedentes de células humanas infectadas con VRSH —.....	43
2— Detección de un único ligando viral presentado diferencialmente por HLA en células infectadas con VRSH —.....	43
3— El péptido M188-195 de VRSH no es un ligando canónico de HLA-Cw4 —.....	46
4— Idéntica jerarquía de unión a MHC de clase I tanto humano como de ratón de dos péptidos virales relacionados —.....	47
5— Diferente conformación de unión a la molécula de HLA-Cw4 del octámero y del nonámero de VRSH —.....	49

***C— Ligandos virales presentados por HLA-B27 en células infectadas por el virus respiratorio sincitial humano. .... 53***

1— Identificación de nueve ligandos virales de HLA en células infectadas por VRSH —.....	53
2— Los ligandos detectados en células infectadas se unen eficientemente HLA- B*2705 —.....	64

**DISCUSIÓN..... 67**

***A— La molécula de clase I, H-2Ld protege in vitro a un epítipo N-extendido del recorte por ERAAP.***

.....	68
<b><i>B— Interacción no canónica de un ligando viral con HLA-Cw4 en células infectadas con el virus respiratorio sincitial humano. .... 70</i></b>	70
<b><i>C— Ligandos virales asociados a HLA-B27..... 73</i></b>	73
1— Los ligandos presentados por HLA-B*2705 en células infectadas por VRSH proceden de proteínas internas virus —.....	73
2— La mayoría de ligandos virales de HLA-B*2705 no están conservados entre los diferentes subgrupos antigénicos de VRSH —.....	74
3— Una fracción significativa del proteoma viral fue presentada en asociación con la molécula de clase I B*2705 —.....	75
<b><i>D. Discusión general —..... 77</i></b>	77

<i>CONCLUSIONES.....</i>	<i>79</i>
<i>REFERENCIAS.....</i>	<i>81</i>
<i>PUBLICACIONES.....</i>	<i>94</i>

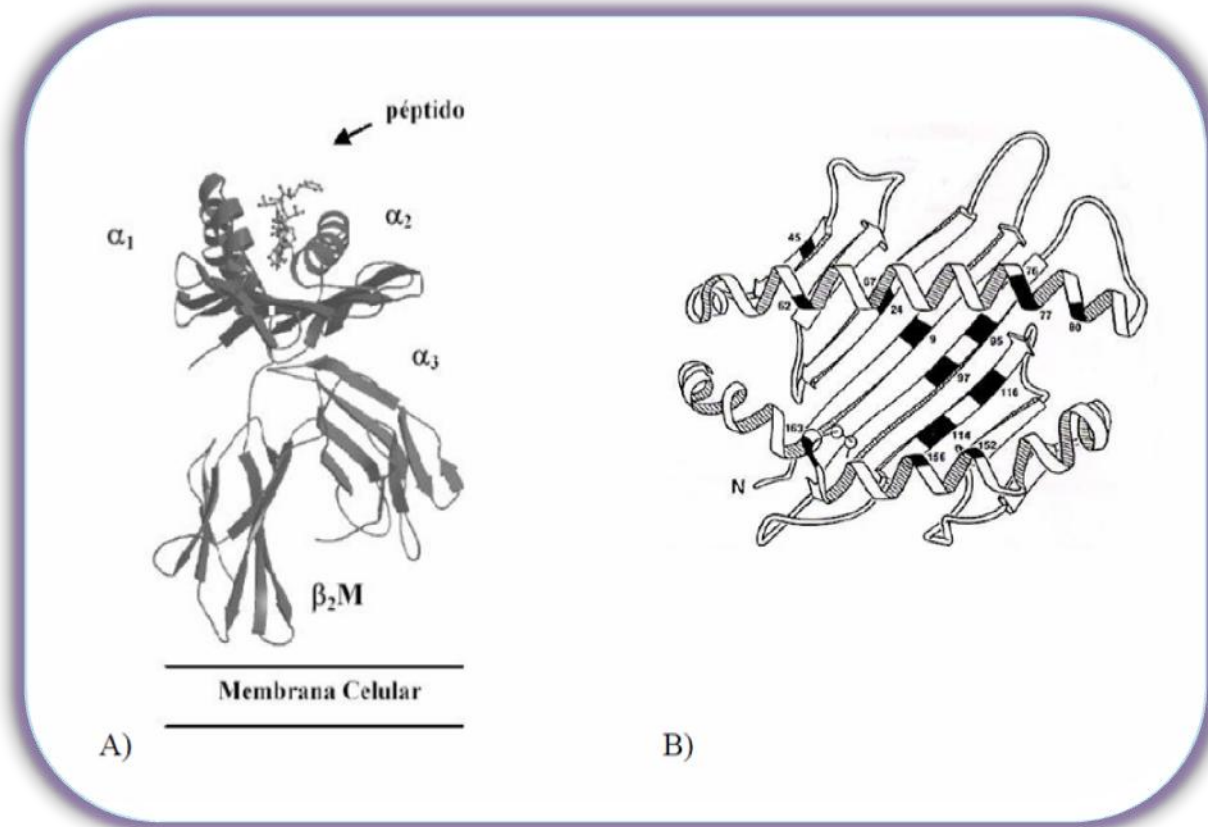
## *INTRODUCCIÓN*

## *INTRODUCCIÓN*

El sistema inmune es el encargado de defender al organismo frente a patógenos, como virus o bacterias. Entre los múltiples mecanismos implicados en esta tarea los linfocitos T citotóxicos (CTLs) son capaces de detectar la presencia de patógenos intracelulares ya que poseen receptores que reconocen péptidos asociados a las moléculas del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) presentados en la superficie de células presentadoras de antígeno (APC) ó de células infectadas. La importancia de las moléculas de MHC en la respuesta inmune se descubrió en 1974 cuando Zinkernagel y Doherty (1) observaron que linfocitos T aislados de un ratón infectado podían reconocer células de otro ratón infectadas por el mismo virus solo en el caso de que ambos expresaran la misma isoforma de MHC, demostrando que en la activación de las células T intervienen tanto determinantes del antígeno como de las moléculas del MHC. Dicho mecanismo se conoce como restricción por el MHC.

### *1. — Molécula de histocompatibilidad de clase I (MHC-I) —*

Las funciones inmunológicas de la molécula de MHC-I, son las de actuar como receptoras y presentadoras de péptidos a los linfocitos T CD8. Las moléculas de MHC de clase I son glicoproteínas de membrana formadas por la asociación no covalente de tres componentes: una cadena pesada o cadena  $\alpha$  de 44 kDa, una cadena ligera de 12 kDa denominada  $\beta$ -2 microglobulina ( $\beta$ 2m) y un péptido antigénico de entre ocho y trece aminoácidos. Mediante técnicas de difracción de rayos X ha podido determinarse la organización tridimensional de estos dominios en distintas moléculas de clase I como la forma en que éstas unen ligandos peptídicos, (2), (3), (4), (5). La cadena pesada consta de una región extracelular de 274 aminoácidos formada por tres dominios ( $\alpha$ 1,  $\alpha$ 2 y  $\alpha$ 3), una porción transmembrana hidrofóbica de unos 25 residuos y una región citoplasmática hidrofílica de alrededor de 30. Los dominios  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2, que son estructuralmente idénticos, constan cada uno de una lámina  $\beta$  antiparalela formada por cuatro cadenas polipeptídicas y de una región larga en  $\alpha$ -hélice (Figura 1A). Estos dominios  $\alpha$ 1 y  $\alpha$ 2 conforman una cavidad que permite la unión del péptido en su interior (25 Å de longitud y 12 Å de ancho) y que se denomina sitio de unión antigénica (Figura 1B). El dominio  $\alpha$ 3 está muy conservado y es estructuralmente homólogo a la  $\beta$ 2m. Contigua al dominio  $\alpha$ 3 se encuentra la región transmembrana encargada del anclaje de la molécula a la membrana celular. La  $\beta$ 2-microglobulina carece de dominio citoplásmico y se mantiene asociada a la región extracitoplásmica de la cadena pesada interaccionando con sus tres dominios, determinando significativamente la estabilidad de la molécula (6).



**Figura 1. Esquema de la estructura tridimensional de una molécula de MHC de clase I.**

A) Se muestran los cuatro dominios extracelulares y la posición del péptido antigénico. B) Esquema de los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$  del MHC-I vistos desde arriba en donde se muestra la hendidura de unión al péptido (7).

Los péptidos unidos a MHC-I funcionan como una parte integral de la molécula de clase I permitiendo su plegamiento y estabilidad en la membrana celular ya que sin péptidos unidos la molécula es altamente inestable (8). Desde un punto de vista estructural la unión de un péptido está determinada por dos características básicas: una es su tamaño, generalmente comprendido entre 8 y 13 aminoácidos (9) y la otra es la conservación de residuos de anclaje en determinadas posiciones cuya localización varían en función del polimorfismo de la molécula de clase I a la cual están unidas. La unión tiene lugar principalmente entre los extremos N-terminal y C-terminal a través de puentes de hidrógeno con los residuos conservados en la cavidad de unión del MHC-I, adoptando una conformación extendida (10) y arqueándose en su parte central para los péptidos más largos (11). La parte central del péptido está orientada normalmente hacia el solvente, por tanto los residuos que se encuentran en esta zona son más accesible al contacto con el TCR. La interacción de algunos de los residuos del péptido denominados residuos de anclaje con estas subcavidades contribuye críticamente en la especificidad de unión MHC/péptido. Las cadenas laterales de los residuos de anclaje interaccionan con zonas polimórficas de la molécula de MHC-I denominadas subcavidades. La mayor parte del polimorfismo descrito entre las moléculas de MHC de Clase I se encuentra en los dominios  $\alpha_1$  y  $\alpha_2$ .

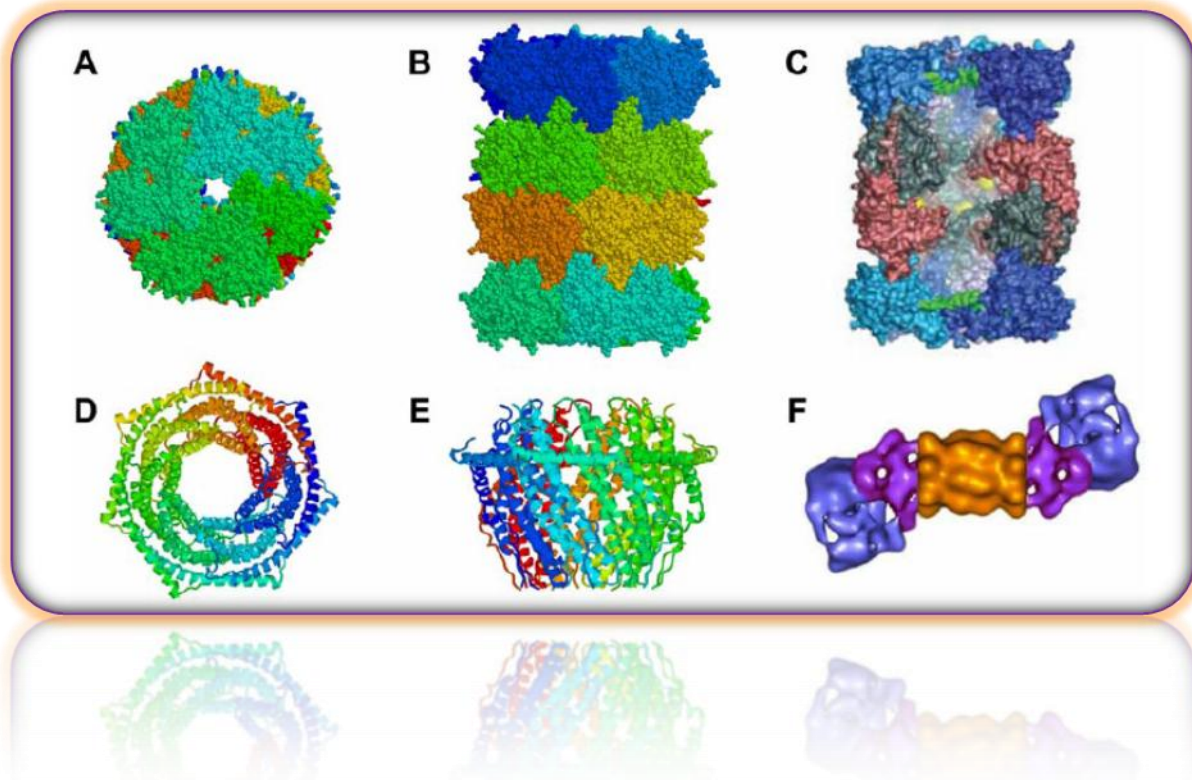
El reconocimiento de los péptidos presentados por moléculas de MHC-I a los linfocitos T se realiza a través del TCR, que se expresa en las células T en forma del complejo TCR-CD3 (12). Una característica de la inmunidad adaptativa es la habilidad que tienen las células T de reconocer su antígeno específico a través de moléculas de MHC y responder contra el (13).

## *2. – Procesamiento de antígeno, formación, transporte y presentación a las moléculas de MHC de clase I –*

### *2.1 – Origen de los péptidos antigénicos –*

Las moléculas de MHC-I se asocian principalmente a péptidos derivados de proteínas degradadas en el citosol y los presentan a las células T CD8+ (14). La mayor parte de la actividad proteolítica del citosol es realizada por el proteasoma (Figura 2), un complejo proteico multicatalítico con actividad proteasa y dependiente de ATP encargado del reciclaje de proteínas propias dentro de la célula (15). El núcleo catalítico del proteasoma o subunidad 20S es una partícula cilíndrica formada por 4 anillos heptaméricos superpuestos. Los anillos internos se componen de siete subunidades  $\beta$  ( $\beta_1$ - $\beta_7$ ) siendo tres de ellas catalíticamente activas (16). Los dos anillos exteriores están constituidos por 7 subunidades  $\alpha$  ( $\alpha_1$ ,  $\alpha_7$ ) no catalíticas cuya función es esencialmente estructural y reguladora. Además, el proteasoma 20S puede asociarse con diversos complejos reguladores (19S o PA700) para conformar el proteasoma 26S (17) implicado en el reconocimiento y degradación dependiente de ATP de proteínas ubiquitinadas. Funcionalmente, el proteasoma puede existir en dos formas: como “proteasoma”, constitutivamente expresado en todas las células, o como “inmunoproteasoma” hallado en células estimuladas con interferones (IFN- $\gamma$ , IFN- $\beta$ ) y TNF- $\alpha$ , expresándose constitutivamente en células presentadoras del timo, el bazo o los ganglios linfáticos así como en líneas celulares linfoides (18). Así, las subunidades catalíticas estándar van a ser reemplazadas por sus homólogas inducibles  $\beta 1i$  (LMP2),  $\beta 2i$  (MECL1), and  $\beta 5i$  (LMP7) en el inmunoproteasoma (19). El procesamiento y presentación de una serie de péptidos antigénicos está favorecido en células que albergan inmunoproteasomas, contribuyendo a dar forma el repertorio de epítopos inmunodominantes. Sin embargo, un número de antígenos principalmente derivados de proteínas propias o tumorales se producen con menor eficiencia por el inmunoproteasoma. Recientemente se ha demostrado la existencia de proteasomas intermedios entre el proteasoma constitutivo y el inmunoproteasoma (20). La contribución de estos complejos reguladores a la ruta de procesamiento y presentación de antígeno por moléculas de clase I no está bien definida. Así, se ha sugerido que el proteasoma 20S podría contribuir a la generación de ligandos en ausencia de reguladores (21).





**Figura 2. Estructura del proteasoma.**

A y B: vistas apical y lateral del proteasoma 20S de *T. Acidophilum*, a partir de (16).

C: corte longitudinal mostrando la cámara catalítica. Los centros activos se representan en amarillo.

D y E: vistas lateral y apical del complejo regulador PA28, a partir de (22).

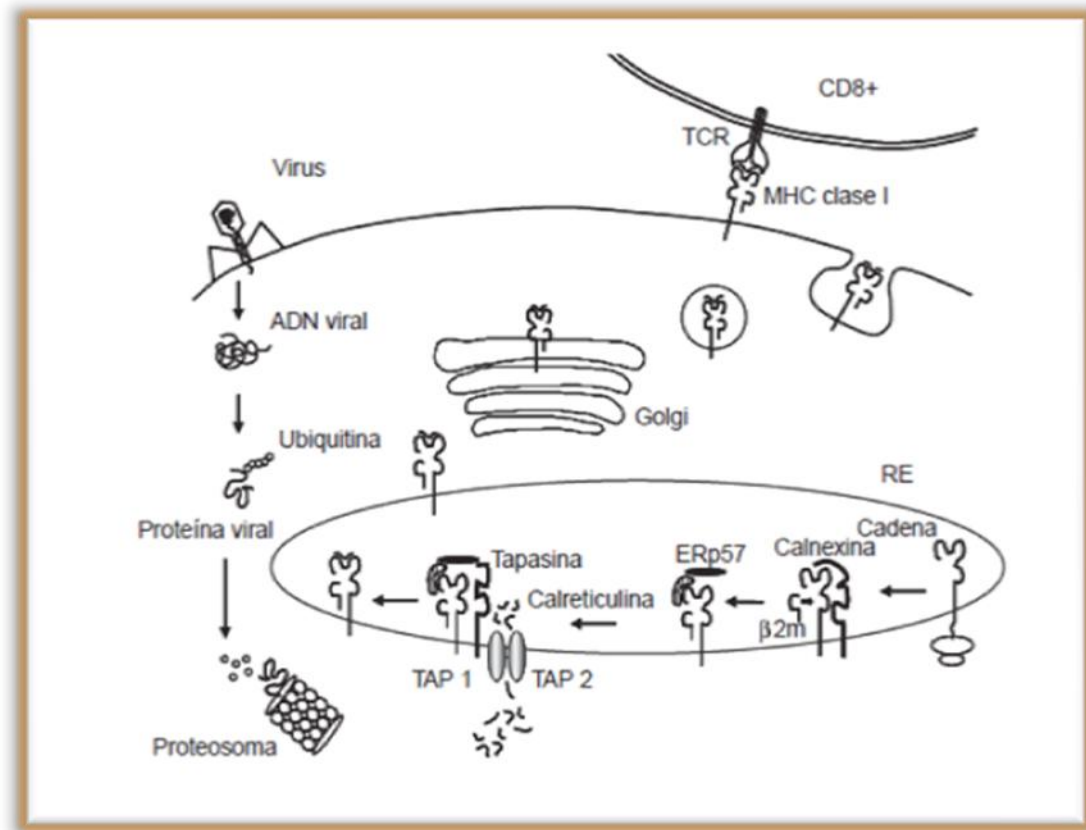
F: Modelo del proteasoma 26S. El núcleo catalítico o proteasoma 20S se representa en naranja y el complejo regulador 19S en azul y morado, a partir de (17).

Se ha sugerido que la tripeptidil peptidasa II citosólica (TPPII) podría tener un papel importante en la generación de ligandos de MHC de Clase I (23). Aunque TPPII elimina bloques de 3 aminoácidos del extremo amino, no obstante puede además cortar a una distancia de más de 9 aminoácidos del extremo amino con lo cual podría generar también el extremo carboxilo de un ligando de MHC de clase I. De hecho TPPII está implicada en el recorte del extremo amino de precursores de epítomos *in vitro* (24) y en la producción independiente del proteasoma de al menos un epítomo *in vivo* (25).

Probablemente una fuente importante de péptidos presentados por las moléculas de clase I son los DRiPs, productos defectivos de la síntesis proteica (26). Son proteínas degradadas cotraduccionalmente como resultado de un mal plegamiento o una traducción defectuosa antes de completar su síntesis (27). Esta fuente de epítomos permitiría generar respuestas tempranas a infecciones víricas presentando péptidos virales en etapas iniciales de la infección generados por el ribosoma. Se ha estimado que los DRiPs constituyen en torno al 30% de las proteínas recién sintetizadas en la célula (28).

## **2.2 – Translocación de péptidos al retículo endoplásmico –**

En la ruta de procesamiento y presentación de antígeno (Figura 3), una vez generados en el citosol los péptidos pasan al RE a través del transportador asociado con procesamiento antigénico (TAP), una proteína de membrana perteneciente a la familia ABC (ATP binding cassette) formada por las subunidades TAP1 y TAP2 (29). Ambos poseen una región N-terminal con múltiples dominios transmembrana y un dominio C-terminal de unión a ATP. El tamaño de los péptidos transportados por TAP varía típicamente entre 8 y 16 aminoácidos (30) y la eficiencia del proceso de translocación se ve modulada por la secuencia del péptido, fundamentalmente por los tres residuos amino terminales y el residuo carboxilo terminal. En concreto péptidos con Pro en posición 2 son desfavorables y se transportan mal por TAP (31). Sin embargo, algunas moléculas de clase I presentan ligandos con secuencias que son incompatibles con TAP, asumiéndose que proceden de péptidos más largos que han sido recortados por aminopeptidasas residentes en el retículo endoplásmico.

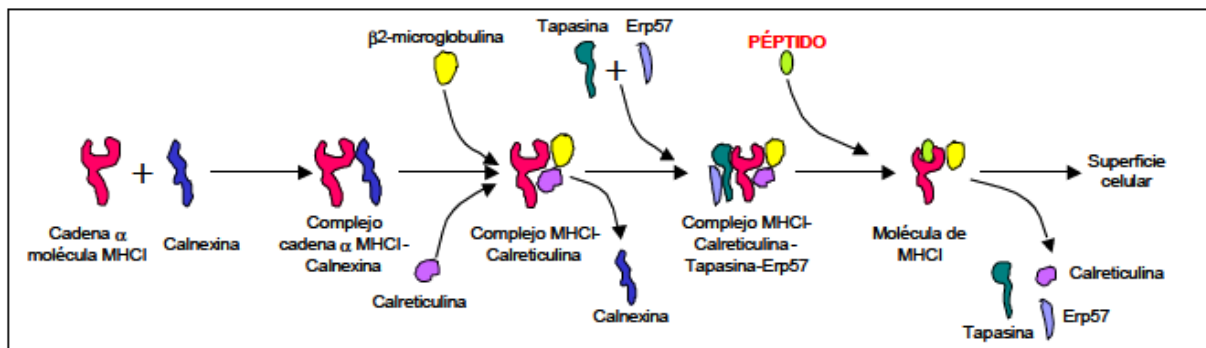


**Figura 3. Procesamiento y presentación antigénica.**

Las proteínas virales en el citosol se degradan mediante el proteasoma a péptidos los cuales entran al retículo endoplásmico a través de los transportadores TAP1 y TAP2. Los péptidos ensamblados a las moléculas de clase I son transportadas a la superficie celular para su presentación posterior a CTLs.

### 2.3 – Ensamblaje y expresión de los péptidos con MHC de clase I –

Una vez que los péptidos generados en el citosol se transportan al RE se unen a la cadena pesada y a la  $\beta 2m$  en un proceso de carga altamente organizado. Así, la cadena pesada de las moléculas de clase I sintetizadas *de novo* se asocia con la calnexina, una chaperona de membrana de 88 kDa (32) que las mantiene parcialmente plegadas hasta que se une la  $\beta 2m$ . La incorporación de la  $\beta 2m$  provoca un cambio conformacional que favorece la sustitución de la calnexina por otra lectina denominada calreticulina (32). Este heterotrímero, formado por la cadena pesada,  $\beta 2m$  y calreticulina puede encontrarse aislado en el retículo endoplásmico (33), pero también se halla formando parte del llamado complejo de carga peptídico, donde se asocia con la tiol oxidoreductasa Erp57 (34), la disulfuro isomerasa PDI (35) y la tapasina, la cual actúa de puente entre todo el complejo y TAP (36). Un esquema del ensamblaje del complejo MHCI-péptido se muestra en la figura 4. La cadena pesada sufre diferentes glicosilaciones durante el proceso de plegamiento y maduración en el RE posibilitando y regulando su interacción con calnexina y calreticulina. La unión del péptido induce un cambio de conformación que estabiliza el complejo trimérico Péptido/Cadena pesada/ $\beta 2m$  y desestabiliza la unión con TAP, lo que provoca la disociación del complejo, siendo dicho complejo exportado a la membrana plasmática a través de la vía exocítica.



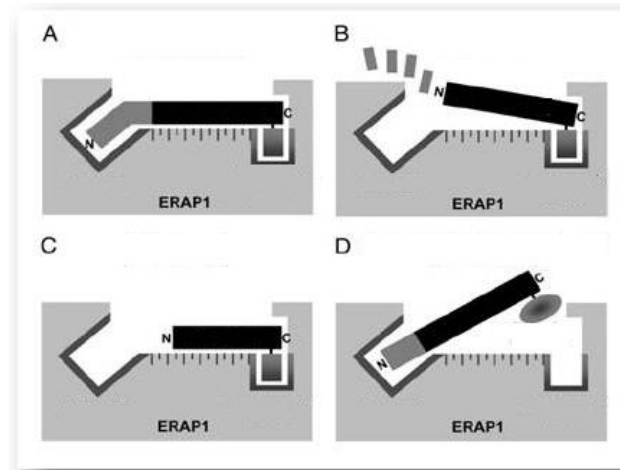
**Figura 4. Esquema del ensamblaje del complejo MHCI-péptido.**

La cadena  $\alpha$  del MHC-I se sintetiza en el citosol y es translocada al lumen del RE donde se asocia con la calnexina que la mantiene parcialmente plegada. La unión de la  $\beta 2$ -microglobulina provoca la disociación de la calnexina y el heterodímero  $\alpha\beta 2m$  se une a la proteína calreticulina. Este trímero forma un complejo con la tapasina y la Erp57 permitiendo la carga de los péptidos que entran en el RE a través de TAP. Una vez unido el péptido, el complejo ya es estable y puede ser transportado a la superficie celular.

### **3. — Aminopeptidasa del Retículo Endoplásmico asociada a procesamiento antigénico, ERAAP —**

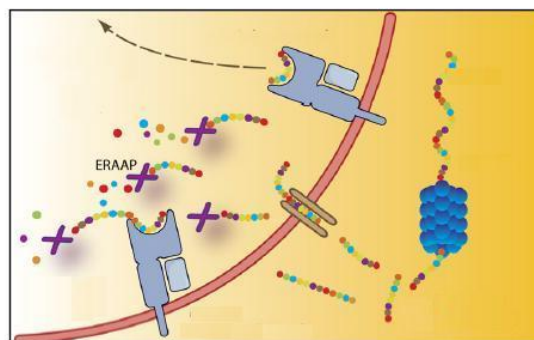
Las proteínas virales recién sintetizadas en el citosol pueden ser degradadas proteolíticamente generando péptidos que tras su transporte al lumen del RE mediante TAP se ensamblan con la cadena pesada del MHC y la  $\beta_2m$  formando un complejo trimolecular esTabla que viaja a través de la ruta exocítica hasta la superficie celular (37). Algunos péptidos pueden ser producidos en su forma final mientras otros son generados como precursores (38). Estos péptidos precursores deben tener el extremo C-terminal adecuado para poder ser presentados por MHC debido a la ausencia de carboxipeptidasas del RE (39). Este conjunto de péptidos enormemente variados que han sido transportados por TAP al RE y todavía no tienen el exacto N-terminal necesitan ser recortados antes de que se produzca el ensamblaje del complejo esTabla final. La enzima residente en el retículo RE que recorta dichos precursores aminoextendidos hasta su longitud final se ha identificado como la aminopeptidasa del RE asociada a procesamiento antigénico (ERAAP) en ratón (40) y sus equivalentes aminopeptidasas del RE tipo 1 (ERAP1) (41, 42) y tipo 2 (ERAP2) (43) en humanos. ERAAP es un miembro de la familia M1 del clan MA de las metaloproteasas dependientes de Zn que están definidas por un motivo conservado en el núcleo catalítico de la enzima de His-Glu-X-X- His-X<sub>18</sub> -Glu (44). Su expresión está fuertemente regulada por interferón- $\gamma$ . Diversos estudios muestran la implicación de ERAAP en presentación antigénica. Así, la reducción de la expresión de ERAAP mediante ARN de interferencia que evitaría el recorte de péptidos en el RE redujo en gran medida la expresión de moléculas de MHC-I en la superficie celular (40). En otro estudio (45) se demostraba que el repertorio de péptidos unidos a MHC en ratones deficientes en ERAAP se encontraba profundamente alterado. ERAP1 es el homólogo de ERAAP de ratón, (90% homología) existiendo además otra aminopeptidasa ERAP2 con una homología mucho menor (50%) que puede recortar ciertos precursores para que el MHC-I presente péptidos antigénicos (46).

Existen 2 modelos mutuamente excluyentes para explicar el mecanismo de funcionamiento de ERAAP. El primero, “modelo de la regla molecular” (47) (Figura 5) propone que los péptidos antigénicos que se unen a MHC I deben tener una longitud entre 9-16 aminoácidos. Existe un hipotético bolsillo fuera del sitio activo de la enzima que uniría la cadena lateral hidrofóbica del residuo C-terminal. Entonces, los residuos N-terminales serían accesibles al sitio activo y la enzima recortaría precursores N-extendidos de forma no procesiva y así los péptidos ya recortados podrían unirse a MHC. Adicionalmente, un posterior estudio indicaba que ERAP1 también reconocería la secuencia interna del péptido (48).



**Figura 5. “Modelo de la regla molecular”.** A. Unión de los residuos C y N-terminales del sustrato a la enzima. B. Los péptidos tienen una cadena hidrofóbica en su C-terminal y la enzima recorta residuos en el extremo aminoterminal. C. Péptidos con una longitud menor de 9 residuos no son accesibles al sitio activo de la enzima. D. Residuos cargados en el C-terminal no son sustratos óptimos para la enzima.

El segundo mecanismo o “Modelo del molde” (49) (Figura 6) implica que los péptidos con motivos de anclaje a MHC adecuados pero todavía demasiados largos en su N-terminal podrían unirse a las moléculas de MHC-I y podrían ser recortados entonces por ERAAP. De esta forma los aminoácidos superfluos del extremo aminoterminal podrían ser recortados hasta generar el epítipo mínimo. En resumen, este modelo implicaría que ERAAP y MHC-I colaboran para generar un repertorio de péptidos apropiado para cada molécula polimórfica de MHC-I.



**Figura 6. “Modelo del molde”.** Este modelo postula que los péptidos con motivos adecuados pero demasiado largos en su N-terminal se unen a moléculas de MHC-I y son entonces recortados por ERAAP.

#### **4. — Ligandos naturales de H-2<sup>d</sup> derivados de la proteína gp160 de VIH —**

Previamente, en el análisis del procesamiento antigénico endógeno de la glicoproteína gp 160 de VIH se identificaron 3 especies moleculares distintas unidas a la molécula de MHC-I murino de H-2L<sup>d</sup> (50). Dichos ligandos presentaban idéntico extremo C-terminal mientras que se diferenciaban en su extremo N-terminal. El ligando natural más pequeño derivado de la proteína gp160 era un péptido de 9 aminoácidos con los motivos de anclaje canónicos para L<sup>d</sup> (51). Además, se identificó un decámero N-extendido respecto al ligando natural mínimo que presentaba los motivos de unión a D<sup>d</sup> (52) y (53). Ambos péptidos eran presentados en células infectadas en cantidades similares. La tercera especie correspondía a un péptido de 15 aminoácidos con una extensión en el N-terminal de 6 residuos respecto al nonámero, los cuales probablemente sobresalían fuera del sitio de unión antigénico de L<sup>d</sup> (50). Dicho péptido era reconocido por CTLs con una antigenicidad ligeramente inferior al nonámero pero siendo más abundante en células infectadas que el epítipo mínimo.

#### **5. — Virus respiratorio sincitial humano (VRSH) —**

##### **5.1 – Características del virus respiratorio sincitial humano –**

El Virus Sincitial Respiratorio Humano (VRSH), es un virus pleomórfico de 150 a 300 nm de diámetro, miembro de la familia *Paramyxoviridae*, clasificándose en el género *Pneumovirus* (54). Recibe su nombre por su tendencia a formar sincitios en los cultivos de los tejidos. Este virus fue aislado en 1956 del tracto respiratorio de un chimpancé que padecía de coriza, enfermedad semejante al resfriado común (55). Es el agente más importante causante de las infecciones del tractorespiratorio inferior produciendo neumonías y bronquiolitis (56) en población pediátrica. En niños recién nacidos la mayoría de las infecciones por VRSH producen sólo síntomas respiratorio superiores, mientras que existen evidencias de que en niños que desarrollaban síntomas en el tracto respiratorio bajo durante la infección con VSRH en el primer año de vida se incrementa el riesgo a desarrollar síntomas parecidos a los del asma durante la edad escolar (57). Además, se ha visto que este virus produce infecciones respiratorias graves en ancianos y en pacientes inmunodeprimidos con alto grado de mortalidad de los pacientes infectados (58). VRSH carece de un tratamiento antiviral eficaz o una vacuna apropiada aunque parece eficaz la administración de anticuerpos neutralizantes del virus en individuos de alto riesgo (59).

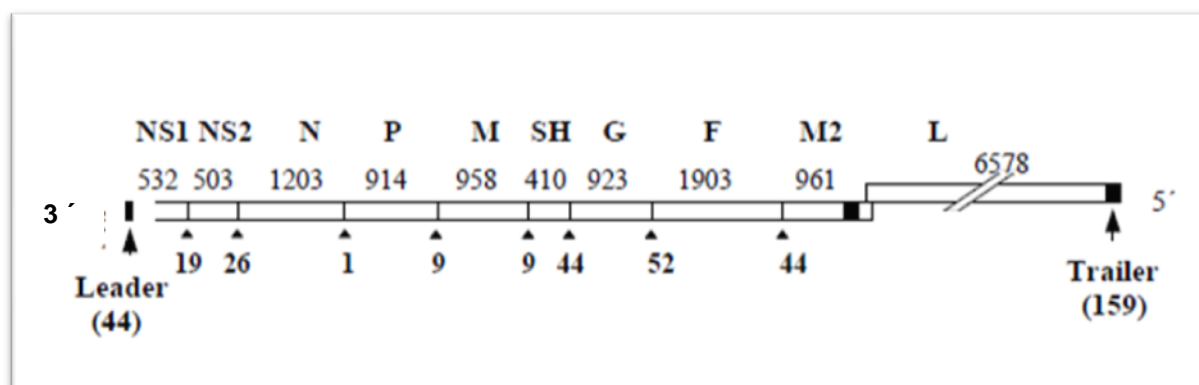
##### **5.2 – Genoma de VRSH –**

El genoma es una cadena simple de ARN de sentido negativo que se encuentra exclusivamente en una nucleocápsida helicoidal que contiene la polimerasa viral. Se compone aproximadamente de 15222 nucleótidos, estructurados en 10 genes, los cuales codifican para 11 proteínas: 2 funcionales y 9 estructurales (Figura 7).



La transcripción se realiza de forma secuencial a partir de un promotor de tal manera que los genes más próximos a él se transcriben con más frecuencia que los genes más alejados. Una vez sintetizadas las proteínas virales se inicia la replicación de ácido nucleico donde el genoma infectante es copiado a una cadena complementaria de sentido positivo que a su vez servirá de molde para producir cadenas de RNA negativo viral. El ciclo de la replicación viral es citoplásmico. Los viriones adquieren una envoltura lipídica por gemación en la membrana plasmática y la entrada en la célula huésped es por fusión de la superficie celular (54).

Se han identificado 2 subgrupos antigénicos de VRSH: A y B atendiendo a su secuencia y su reactividad frente a anticuerpos aunque la mayoría de los estudios realizados se centran en las cepas A2 y Long del subgrupo A (54).



**Figura 7. Mapa genético de la cepa Long de VRSH.**

En cada extremo del ARN se encuentran dos regiones no codificantes, un ARN leader en el extremo 3' de 44 nucleótidos, y una región de 159 nucleótidos en el extremo 5'. Veintiuno de los últimos 24-26 nucleótidos de ambos extremos son complementarios lo que indica un alto grado de identidad entre los promotores de los extremos 3' del ARN genómico y antígenómico.

### 5.3 – Proteínas virales –

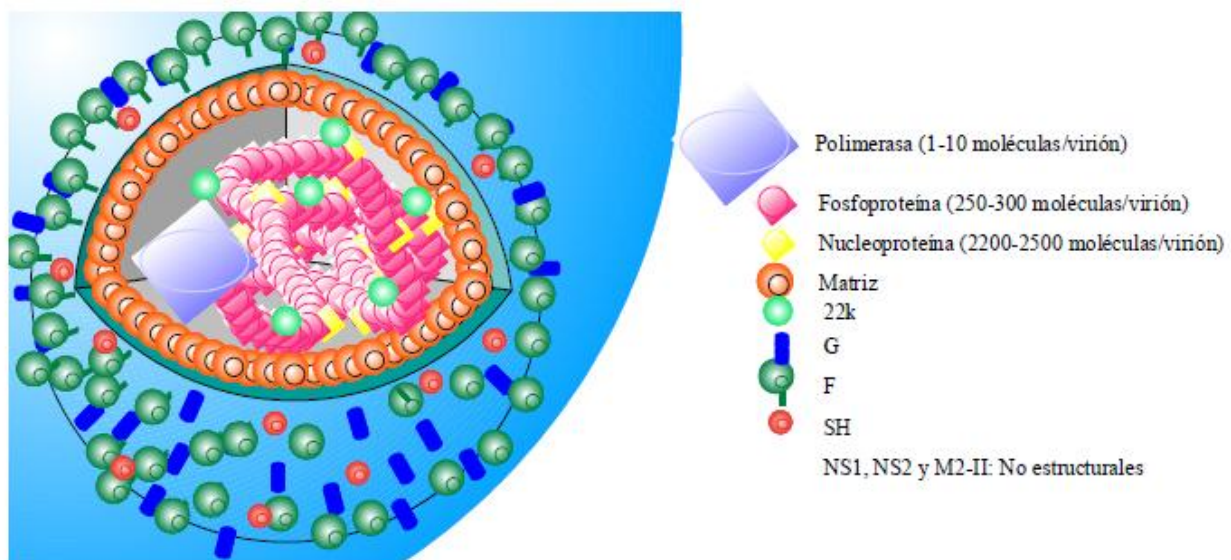
El virión de VRSH consiste en una nucleocápsida helicoidal dentro de una envuelta lipoproteica que el virus adquiere al salir de la célula hospedadora (60). La envuelta contiene tres glicoproteínas virales de transmembrana en la superficie celular: la proteína de unión al receptor o proteína G, la proteína de fusión o proteína F y una proteína pequeña hidrofóbica o proteína SH. Las glicoproteínas están organizadas por separado en espículas virales que se visualizan como proyecciones cortas y poco separadas entre sí. La proteína matriz (M) forma una capa proteica en la cara interna de la envuelta. La nucleocápsida de VRSH es una hélice simétrica entre 12 a 15 nm en la que se encuentra el RNA viral asociado con la nucleoproteína (N), la fosfoproteína (P), un factor antiterminador de la transcripción (M2-22k) y la polimerasa (L) (54).

A continuación se indican brevemente las características principales de las once proteínas de VRSH (Figura 8).

- **Nucleoproteína (N):** Es una proteína contenida en la nucleocápsida, de 391 aa de longitud y de naturaleza ligeramente básica. Se encuentra junto con las proteínas P, 22k y probablemente L en inclusiones citoplásmicas presentes en la nucleocápsida de células infectadas con el virus o transfectantes que expresan los genes correspondientes (61). Esta proteína se puede unir fuertemente al ARN genómico y dicho complejo con el RNA sirve de molde funcional para la polimerasa viral.
- **Fosfoproteína (P):** Presenta 219 aminoácidos en su secuencia siendo de naturaleza ácida e hidrofílica encontrándose fosforilada además en diversos residuos de Ser localizados principalmente en las zonas central y C-terminal de la molécula (62). Dicho extremo C terminal interacciona con la proteína N. La proteína P funciona como un cofactor de la RNA polimerasa viral y debe ser fosforilada para ser funcional.
- **Proteína L:** Es la RNA polimerasa del virus. Es de naturaleza básica e hidrofóbica. Posee seis regiones altamente conservadas entre las RNA polimerasas de distintas familias del virus (63).
- **Proteína matriz (M):** Está localizada en la cara interna de la envuelta viral. Es relativamente básica con un dominio hidrofóbico en el C-terminal de la molécula que mediaría la interacción con la membrana. Esta proteína puede unirse a la proteína N e intracelularmente M colocaliza con las proteínas N y P en los cuerpos de inclusión citoplasmáticos mencionados anteriormente.
- **Proteína M2-22k:** Es una proteína muy básica e hidrofílica. Se encuentra colocalizando con las proteínas N y P en los cuerpos de inclusión citoplásmicos presentes en las células infectadas por el virus. La proteína M2-22k es un antiterminador de la transcripción siendo esencial para la viabilidad del virus.
- **Proteína M2-2:** La proteína M2-2 tiene un papel en la regulación de la síntesis de ARN y su transcripción (64). Inicialmente la abundancia de la proteína M2-2 en las células infectadas es baja pero aumenta su cantidad a lo largo de la infección.
- **Proteínas no estructurales NS1 y NS2:** Son proteínas que se detectan sólo en pequeñas cantidades en la preparación de los viriones purificados y por lo tanto se consideran no estructurales. La proteína NS1 se ha demostrado que coprecipita con la proteína M, mientras que la proteína NS2 colocaliza en las células con la proteína N. La NS1 es un inhibidor de la síntesis de RNA. La proteína NS2 es inestable con una vida media en las células infectadas de aproximadamente 30 minutos. La proteína NS2 no es esencial para la replicación viral, aunque en su ausencia los virus son atenuados (65). Las proteínas NS1 y NS2 por separado o juntas no parecen tener un papel importante en el ensamblaje de las partículas virales.
- **Proteína SH:** Es una proteína integral de membrana que contiene una larga región hidrofóbica y una región C-terminal orientada extracelularmente. Sólo se incorpora en pequeñas cantidades en los viriones. La función postulada de esta proteína implica junto con las proteínas F y G la formación de sincitios (66). La expresión de la proteína SH en bacterias aumenta la permeabilidad celular a compuestos de bajo peso molecular. Esta proteína forma canales de membrana similares a los que produce la proteína M2 del virus de la gripe. Así, podría estar implicada en la desestabilización de la membrana de la célula infectada (67).



- **Glicoproteína G:** Es una glicoproteína transmembrana tipo II que contiene una región hidrofóbica cerca del extremo N-terminal que le sirve tanto de péptido señal como de anclaje a la membrana, dejando en el extremo C-terminal dos terceras partes de la molécula orientadas hacia el exterior. La proteína G también se sintetiza en forma soluble debido a que el comienzo de la traducción se puede producir en un segundo codón de iniciación en fase con el primero situado en el aminoácido 48 (68). Aproximadamente el 16-20% del total de las moléculas de proteína G sintetizadas en cultivo son solubles. Está altamente glicosilada y tiene una estructura no globular cuyo ectodominio tiene similitud con las mucinas que son glicoproteínas que forman una barrera protectora en los tractos respiratorio, reproductor y gastrointestinal. Es en este último dominio donde se localizan cuatro residuos de Cys conservados en todas las cepas de virus secuenciadas y que forman parte de un motivo estructural que se ha propuesto como el sitio de unión al receptor. La proteína G no es esencial para el ensamblaje del virión y ni en la propagación in vitro o in vivo, aunque en la mayoría de los casos aumenta el crecimiento viral (54). Además, es la responsable de que el virus se una al receptor celular en las primeras etapas del ciclo infeccioso. Se ha propuesto que dicho receptor está constituido por proteoglicanos sulfatados presentes en la superficie celular (69).
- **Glicoproteína F:** Es una glicoproteína tipo I, que se inserta en la membrana por la región hidrofóbica C-terminal. Esta proteína se sintetiza como un precursor inactivo F0 que es procesado proteolíticamente por la proteasa celular Furina en el trans-Golgi dando lugar a dos subunidades F1 y F2 que quedan unidas covalentemente por puentes disulfuro antes de alcanzar la superficie celular (70). Esta proteína dirige la penetración viral por la fusión entre la envoltura del virión y la membrana plasmática de la célula huésped permitiendo la entrada de la nucleocápsida en el citoplasma celular. Así mismo, la proteína F expresada en la superficie celular puede mediar la fusión con las células vecinas para formar sincitios.



**Figura 8 . Representación esquemática de la estructura de VRS**  
Se señala la localización de las distintas proteínas que componen el virión.

#### **5.4 – Respuesta inmunitaria frente a la infección por VRSH –**

En general, la inmunidad humoral frente a VRSH protege de infecciones del tracto respiratorio mientras que la respuesta celular es la responsable del control y eliminación de la infección por este virus (71). Así, el que pacientes inmunocomprometidos en su inmunidad celular presenten una enfermedad asociada a VRSH más severa y prolongada indica la importancia de las células T en el control de la infección.

Hasta la actualidad se han realizado pocos estudios que evalúen la respuesta inmune celular citolítica asociada a este virus, concentrándose la mayoría de ellos sobre ratones de la cepa BALB/c. Así, las proteínas F, N y M2-1 de VRSH inducen respuestas citolíticas primarias en el mencionado modelo murino (72) y (73). En particular, la infección con un virus vaccinia recombinante que codifica para el epítipo inmunodominante de la proteína M2-1 restringido por H-2<sup>d</sup> induce niveles de CTL específicos comparable a la infección por VRSH (74). Estudios de depleción de células T tanto de CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup> indican la importancia de la respuesta inmune celular en la eliminación completa del virus (75). Además, se han detectado en sangre periférica de pacientes, células CD8<sup>+</sup> específicas contra VRSH (76) y (77). Otros estudios muestran que la inmunización con antígenos confieren resistencia a una posterior reinfección, aunque este efecto desaparece al mes del tratamiento (78) y (79). En pacientes seropositivos al menos 6 de las once proteínas codificadas por el genoma de VRSH son capaces de estimular células citotóxicas de memoria específicas frente a VRSH (80), aún cuando hasta la actualidad únicamente se han identificado en humanos unos pocos de los epítipos responsables de esta respuesta (81), (82), (83), (84) y (85).

## ***OBJETIVOS***

## ***OBJETIVOS***

El objetivo general de esta tesis ha sido el análisis mediante técnicas inmunoproteómicas de ligandos virales presentados por MHC de clase I, centrándose en los siguientes aspectos:

1. Estudio del mecanismo de acción de la enzima ERAAP.
2. Identificación de ligandos virales presentados por HLA de clase I procedentes del virus respiratorio sincitial humano, VRSH.

## *MATERIALES Y MÉTODOS*

## *Metodología*

### *1. — Líneas celulares —*

B27-C1R es un transfectante (86) de la línea celular linfóide humana HMy2.C1R (C1R) con baja expresión de sus moléculas endógenas de MHC-I (87) y (88). T2-L<sup>d</sup> es una línea celular linfoblastoide humana deficiente en TAP y transfectada con la molécula de MHC murina Ld (89). RMA-S es una línea celular murina deficiente en TAP (90). Previamente se han descrito transfectantes de RMA-S que expresan diferentes alelos de MHC humanos: HLA-A2, (91), -B27 (92), -B35 (93), y Cw4 (94). Todas las líneas celulares se cultivaron en RPMI 1640 suplementado con 10% de suero fetal bovino (FBS) y  $5 \times 10^{-5}$  M de  $\beta$ -mercaptoetanol.

### *2. — Anticuerpos —*

Los anticuerpos utilizados fueron el policlonal anti-VRSH FITC que reconoce las proteínas F y G de VRSH (Chemicon Internacional, Single Oak Drive, Temecula, CA, EE.UU) y los anticuerpos monoclonales 34-5-8S (específico para H-2D<sup>b</sup>) (95), 30-5-7S (específico para H-2L<sup>d</sup>) (96), W6/32 (específico para un determinante monomórfico de moléculas de clase I HLA-A, -B, -C) (97), PA2.1 (específico para HLA-A2) (98) y ME1 (específico para HLA-27, B7, Bw22) (99).

### *3. — Péptidos sintéticos —*

Los péptidos se fabricaron en un sintetizador modelo 433A, (Applied Biosystem, Foster City, CA, EE.UU) y se purificaron por IE-HPLC y/o RP-HPLC (pureza > 99). Algunos péptidos se derivaron de la secuencia <sup>313</sup>KIRIQRGPGRAFVTI<sup>327</sup> del loop V3 de la glicoproteína de la envuelta de VIH-1. Estos péptidos se nombraron de acuerdo al primer residuo, la longitud y el último residuo. Entonces, G9I se refiere al nonúmero de secuencia <sup>319</sup>GPGRAFVTI<sup>327</sup>. Los análogos monosustituidos por Ala de los péptidos de VIH-1 fueron nombrados de acuerdo al residuo sustituido (Ala → Pro) y su posición dentro del péptido de VIH-1. Por lo tanto, A2-G9I se refiere a la secuencia del nonúmero GAGRAFVTI. Los análogos monosustituidos por Ala de los péptidos de la Matriz de VRSH fueron nombrados de acuerdo con la posición del residuo sustituido y su longitud. Por lo tanto, el péptido MA2-8 se refiere a la secuencia del octámero de AATNAKII. Los siguientes péptidos sintéticos se utilizaron como controles en ensayos de estabilidad del complejo MHC/péptido: KPNA2 (GLVPFLVSV, restringido por HLA-A2) (100), Flu NP (SRYWAIRTR, restringido por HLA-B27) (101), EBNA3 (YPLHEQHGM, restringido por HLA-B35) (102) y C4CON (QYDDAVYLK, restringido por HLA-CW4) (103).

La masa molecular correcta de los péptidos se estableció por espectrometría de masas MALDI-TOF y su composición correcta se determinó mediante espectrometría de masas tipo trampa de iónica (ESI-IT) acoplada a un microHPLC.

#### **4. — Complejos péptido-H-2L<sup>d</sup> —**

Los péptidos sintéticos K15I y R13I se plegaron junto con la cadena pesada de MHC-I, L<sup>d</sup> y la  $\beta$ -2 microglobulina y se purificaron como se describe previamente (104) por “NIH” (Emory University, Atlanta, GA, EE.UU). Además, alícuotas de estos complejos fueron desnaturalizadas con ácido trifluoracético a una concentración final de 0,1% y la identidad del péptido se confirmó mediante espectrometría de masas MALDI-TOF y ESI-IT.

#### **5. — Digestión con la enzima recombinante ERAAP —**

La enzima recombinante purificada ERAAP (R&D System, Minneapolis, MN, EE.UU) se incubó a los tiempos indicados a 37°C con los péptidos sintéticos purificados y/o los complejos péptido-H-2L<sup>d</sup> en la relación molar indicada de enzima/sustrato en 50 mM Tris (pH 7,4) y 1 mM de DTT. La adición de ácido trifluoracético (TFA) a una concentración final de 0,1% sirvió para parar la reacción y desnaturalizar las proteínas.

#### **6. — Aislamiento de péptidos unidos a HLA —**

En un primer ensayo se utilizaron  $2 \times 10^9$  células del transfectante B27-C1R tanto infectadas como no infectadas con VRSH para poner a punto la técnica y dichas células fueron lisadas posteriormente con una solución que contenía 1% de Igepal CA-630 (Sigma, Steinheim, Alemania), 20mM Tris-HCl, 150 mM NaCl pH 7,5 en presencia de un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma). Posteriormente se utilizaron  $4 \times 10^{10}$  células del transfectante B27-C1R tanto infectadas como no infectadas con VRSH y se lisaron en las mismas condiciones. Estos lisados se sometieron a centrifugación diferencial durante 10 minutos a 1000 x g. Después de 1 hora a ultracentrifugación de 35.000 x g, el sobrenadante se aplicó sobre una columna de sefarosa acoplada al anticuerpo W6/32 lo que permite aislar los complejos HLA-péptido que se encontraban en el sobrenadante de la fracción soluble. Tras lavar exhaustivamente las columnas, los inmunocomplejos de HLA se eluyeron a temperatura ambiente con 0,1% TFA. El eluido desnaturalizado se filtró a través de un Centricon 3 (Amicon, Beverly, MA, EE.UU) para separar los péptidos de la cadena pesada de HLA, la  $\beta$ 2m y el anticuerpo W6/32.

La mezcla de péptidos procedente del segundo extracto de  $2 \times 10^{10}$  células del transfectante B27-C1R se concentró mediante un sistema de vacío SpeedVac (Savant Global Medical Instrumentation, Ramsey, MN, EE.UU) y más tarde se fraccionó por cromatografía líquida de alto rendimiento HPLC de fase reversa en un cromatógrafo Waters Alliance (Waters, Milford, MA, EE.UU) utilizando una

columna Vydac C18 (0.21x25 cm) con un tamaño de poro de 5µm (Vydac, Hesperia, CA, EE.UU) según lo descrito previamente (105) y (106).

## **7. — Espectrometría de masas tipo MALDI-TOF —**

### **7. a — Espectrometría de masas tipo MALDI-TOF aplicado a las digestiones con la enzima ERAAP —**

La espectrometría de masas MALDI-TOF se realizó utilizando un equipo Reflex IV (Brucker-Franzen Analytik, Bremen, Alemania) operando en el modo de reflexión ión positivo. Las muestras fueron deshidratadas, resuspendidas en 1µl de tampón TA (33% de acetonitrilo acuoso, 0,1% TFA) y mezcladas con 1µl de matriz de ácido α-cianohidroxicinámico en la misma solución. Un microlitro de mezcla se deshidrató y fue posteriormente analizado. Las intensidades obtenidas en cada tiempo de todos los péptidos se sumaron y esta suma se normalizó al 100% para su posterior representación.

### **7. b — Espectrometría de masas tipo MALDI-TOF del extracto de $2 \times 10^9$ células —**

Las fracciones de HPLC se analizaron mediante un espectrómetro de masas MALDI-TOF Reflex IV (Brucker-Franzen Analytik, Bremen, Alemania) operando en el modo de reflexión ión positivo. Las muestras fueron deshidratadas en el sistema SpeedVac (Savant Global Medical Instrumentación, Ramsey, MN, EE.UU) y resuspendidas en 1µl de tampón TA (33% de acetonitrilo acuoso, 0,1% TFA). Una quinta parte del volumen se cargó en una placa MTP 384 massive MALDI insert (Bruker Daltoniks), y se dejó secar a temperatura ambiente. El resto de cada fracción de HPLC se almacenó a 4 °C. Luego se añadió a cada pocillo de la placa 0,6 µl de solución de matriz de ácido α-ciano-4-hydroxicinnámico (Bruker Daltoniks) a una concentración de 3 mg/ml, dejándose secar a temperatura ambiente. Los datos de MS se obtuvieron en el rango de masa de 400-3000 Da, en el modo de reflector positivo a 25 kV y posteriormente fueron analizados utilizando el programa Flex Analysis 2.0 (Bruker Daltoniks). Cada espectro se calibró externamente con la mezcla estándar de calibración de péptidos (Daltoniks Bruker, Producto # 206195) para conseguir una medida de masa con error inferior a 25 ppm.

## **8. — Espectrometría de masas tipo electrospray trampa iónica —**

### **8. a — Espectrometría de masas tipo electrospray trampa iónica aplicado a las digestiones con la enzima ERAAP —**

Las alícuotas del total de cada una de las digestiones se desecaron y disolvieron en 10µl de 0,1% de ácido trifluoracético en agua y posteriormente se secuenciaron en un espectrómetro de masas tipo electrospray trampa iónica modelo Deca XP LCQ (Termo Electrón San Jose, CA, EE.UU) acoplado a un microHPLC (Termo Electrón) con una columna Biobasic C<sub>18</sub> de 150 x 0,18 mm. Los eluyentes



usados fueron los siguientes: A, 0,5% ácido acético en agua; B, 80% acetonitrilo conteniendo 0,5% ácido acético. El gradiente utilizado fue de 0-40%B en 24 minutos, 40-100% en 5 minutos a un flujo de 1,5µl/min.

#### ***8.b – Espectrometría de masas tipo electrospray trampa iónica del extracto de $2 \times 10^9$ células –***

Se fragmentaron aquellas masas moleculares previamente seleccionadas mediante análisis diferencial por MALDI-TOF y con una ventana de aislamiento ( $m/z$ ) de  $\pm 1,5$  Da (107) en el espectrómetro de masas modelo Deca XP LCQ (Thermo Electrón) de forma similar al apartado 8.a.

#### ***8.c – Espectrometría de masas tipo electrospray trampa iónica del extracto de $4 \times 10^{10}$ células –***

La mezclas de péptidos obtenida después de la ultrafiltración se concentró con columnas Micro-Tip en fase reversa ( $C_{18}$ , 200 µl, Harvard Apparatus, Holliston, MA, EE.UU). Previamente, cada columna  $C_{18}$  se equilibró con una solución de 80% de acetonitrilo en 0,1% TFA, se lavó con 0,1% de TFA, y por último se cargó con la mezcla de péptidos. Después, la columna se lavó con un volumen adicional de 0,1% de TFA y finalmente los péptidos se eluyeron con 80% de acetonitrilo en 0,1% de TFA. Las muestras peptídicas se concentraron hasta 18 µl utilizando centrifugación en vacío.

La mezcla peptídica se analizó en tres carreras diferentes de HPLC en un espectrómetro de masas modelo Orbitrap XL (Thermo Electron) acoplado a un sistema de HPLC (Eksigent, Dublin, CA, EE.UU). Los péptidos se fraccionaron a través de columnas capilares Reprosil  $C_{18}$  de 75 micrones de diámetro interno (108) con un gradiente de 7-40% de acetonitrilo durante 2 h en presencia de 0,1% de ácido fórmico. Se seleccionaron las siete masas más intensas correspondientes a iones de carga +1, +2 ó +3 detectados en cada momento para su posterior fragmentación mediante Disociación Inducida por Colisión, CID.

### ***9. – Búsqueda de homología de secuencia en base de datos –***

La interpretación de los diferentes espectros de fragmentación se llevó a cabo utilizando las siguientes aplicaciones bioinformáticas: Pep-Miner (109), Mascot (Server 2.2 Matrix Science) (110) y Proteome Discoverer 1.0 SP1 (Thermo Fisher) que combina los resultados de los programas Sequest 3.31 y BioWorks Browser 3.3.1 SP1 (Thermo Fisher) (111) utilizando las entradas correspondientes a proteínas celulares humanas y virales de la base de datos del NCBI en su versión de junio 2008 que incluye 574.003 proteínas.

La tolerancia del ión parental se fijó en 0,005 Da y la de los iones de fragmentación en 0,5 Da. Además, esta búsqueda no se limitó por ningún tipo de sesgo metodológico (selección de proteínas individuales, uso de algoritmos para motivos de anclaje de HLA, especificidad enzimática, etc.). Los

péptidos identificados se seleccionaron siguiendo los criterios numéricos siguientes: Pep-Miner > 75, Mascot > 20, Sequest Xcorr > 2, P (PEP) con Bioworks Browser <  $1 \times 10^{-4}$  y Proteome Discoverer > 20. Cuando el espectro MS/MS se asignaba a varias secuencias, sólo se analizaba el péptido con el mejor valor obtenido en los diferentes métodos bioinformáticos.

## **10. — Ensayos de estabilidad del complejo MHC/péptido —**

Células T2 ó RMA-S transfectadas con distintos alelas de MHC se incubaron a 26 °C durante 16 horas en medio RPMI 1640 suplementado con 10% de FBS inactivado por calor. Posteriormente, las células se lavaron y se incubaron durante 1 hora a 26°C con diferentes concentraciones de los péptidos resuspendidos en medio sin FBS, se transfirieron a 37 °C durante 4 h y posteriormente se recogieron para su análisis por citometría de flujo. Las muestras se adquirieron en un citómetro de flujo FACSCanto (BD Biosciences, San Jose, CA, EE.UU) y se analizaron utilizando el programa CellQuest Pro 2.0 (BD Bioscience). La intensidad de fluorescencia de las células incubadas sin péptido fue cercana a la tinción de sólo el anticuerpo secundario. El índice de fluorescencia se calculó en cada momento como la relación entre la media de fluorescencia de la muestra y la media de fluorescencia del control incubado sin péptido. La unión de algunos péptidos se expresó también como  $C_{50}$ , la cual es la concentración molar del péptido en donde se obtiene el 50% de la fluorescencia máxima dentro de un rango de concentraciones entre 100 y 0,001  $\mu$ M.

### **1. — Dinámica Molecular —**

**Estructuras iniciales.** La estructura cristalográfica del péptido C4CON con HLA-Cw4 se obtuvo del archivo PDB 1qqd de la base de datos de estructuras del NCBI. Tomando como modelo dicho archivo PDB 1qqd y mediante la utilización del programa MODELLER9v7 se construyó el modelo de unión del péptido M187-195 de VRSH a la molécula de HLA-Cw4. Para llevar a cabo la modelización del péptido M188-195, se eliminó el residuo terminal de Asn del modelo del péptido M187-195 de VRSH. Los estados de protonación de los grupos ionizables de los tres sistemas se calcularon utilizando el servidor H<sup>++</sup> (<http://biophysics.cs.vt.edu/H++>) (112) y (113). La posiciones de los átomos de hidrógeno, de las cargas atómicas estándar y los radios de todos los átomos se asignaron de acuerdo con el campo de fuerza ff03 (114). Los complejos se ajustaron al modelo de agua cúbica TIP3P para garantizar que la distancia más corta entre el soluto y el borde de la caja fuera mayor de 13 Å (115). Además, se agregaron otros iones para mantener la electro neutralidad del conjunto. Se realizaron tres minimizaciones consecutivas: la primera implicando solamente a átomos de hidrógeno, la segunda sólo a moléculas de agua e iones y la tercera a todo el sistema.

**Detalles de simulación.** Las anteriores estructuras minimizadas se simularon con los programas “NPT ensemble”, “Periodic Boundary Conditions” y “Particle Mesh Ewald” para tratar interacciones de gran

rango electrostático. Los sistemas se calentaron y equilibraron en dos pasos: i) 200 ps de “MD Heating” de todo el sistema desde 100 K a 300 K, y ii) el equilibrio de todo el sistema durante 1 ns a 300K. Las estructuras equilibradas fueron los puntos de partida para las simulaciones MD a 10ns a una temperatura constante de 300 K y a una presión de 1 atm. El “algoritmo SHAKE” se utilizó para mantener las uniones de los átomos de H en su longitud de equilibrio y permitir un intervalo de tiempo de 2 fs para la integración de la ecuación de “Newton”. Los campos de fuerza ff03 y TIP3P tal como se aplican dentro del programa “AMBER 10” (<http://ambermd.org/>) se utilizaron para describir las proteínas, los péptidos y las moléculas de agua. Se utilizaron intervalos de 20 ps procedentes de la trayectoria dinámica molecular para el posterior análisis.

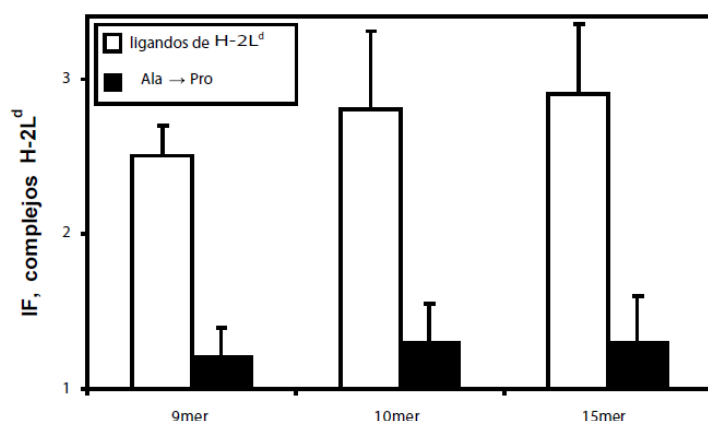
**Análisis de las energías de interacción.** Se calcularon las energías libres de unión entre los péptidos y la molécula de HLA-Cw4 utilizando el método “MM-GBSA” tal y como se aplica en el programa “AMBER 10” (116). Para caracterizar mejor las interacciones entre los péptidos y MHC se llevó a cabo un análisis de la energía de descomposición entre los residuos de los péptidos y los residuos de HLA-Cw4 utilizando un límite de 5Å desde los péptidos. La contribución polar a las energías libres de solvatación se calculó con el modelo generalizado de Bohr “GB”, mientras que la no polar se estimó usando combinaciones lineales del método de parejas solapantes para calcular las superficies de las zonas accesibles (117). Estos cálculos se realizaron para cada simulación instantánea utilizando el modelo apropiado del programa “AMBER 10”.

## ***RESULTADOS***

## ***A- La molécula de clase I, H-2Ld protege in vitro a un epítipo N-extendido del recorte por ERAAP.***

### ***1. — ERAAP recorta eficientemente a un sustrato natural soluble —***

En un estudio previo (50) se identificó un conjunto de tres ligandos naturales de MHC-I de 15, 10 y 9 residuos de longitud igual de abundantes y altamente antigénicos derivados de una misma región de la proteína gp 160 de VIH. Se llevaron a cabo ensayos de estabilidad de complejos MHC-péptido en células deficientes en TAP transfectadas con la molécula presentadora Ld para demostrar que estos 3 péptidos se unían de manera similar a moléculas H-2Ld. El cambio del residuo del motivo de anclaje canónico prolina por alanina suprimía la interacción con el MHC tanto de los péptidos extendidos en el extremo N-terminal K15I y R10I como del ligando mínimo (Figura 9). Esto indica que estos 3 ligandos se unen a la molécula de Ld mediante el motivo canónico de prolina. Por lo tanto, en los péptidos K15I y R10I el respectivo extremo N-terminal sobresale del sitio de unión antigénico. Estos datos confirman el estudio anterior sobre la naturaleza de estas interacciones (50).

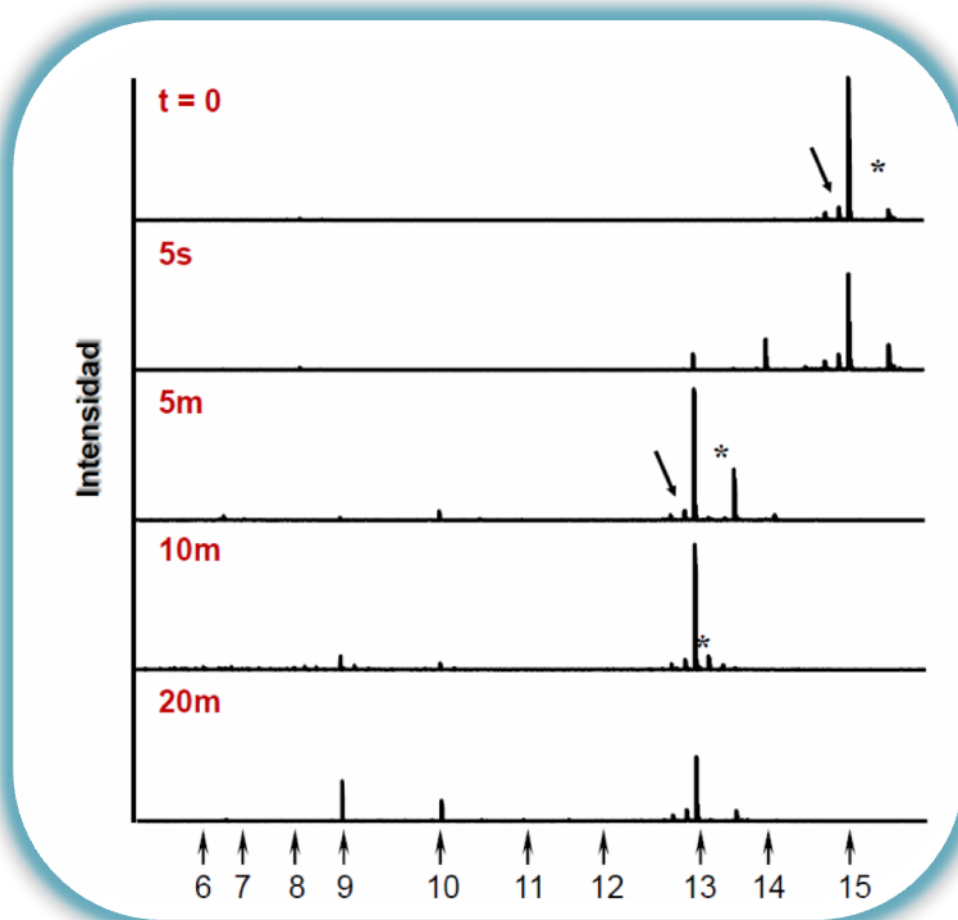


**Figura 9. Ensayo de estabilización de HLA con ligandos sintéticos de VIH.**

Medida por citometría de flujo de la estabilidad en la superficie celular de moléculas H-2L<sup>d</sup> en células RMA-S transfectadas. Los péptidos utilizados fueron los ligandos naturales de VIH G9I, R10I y K15I (barras en blanco) y sus respectivos análogos peptídicos monosustituidos en Ala A2-G9I, A3-R10I, y A8-K15I (barras en negro). Los resultados se calcularon como IF±SD.

Para estudiar la susceptibilidad a la actividad de la aminopeptidasa el péptido sintético K15I se incubó con ERAAP recombinante. Los productos generados después de la digestión enzimática por esta proteasa fueron analizados mediante espectrometría de masas a diferentes tiempos. A tiempo 0 en ausencia de enzima, el sistema permitía la detección de una especie molecular con la misma relación m/z que el sustrato K15I (Figura 10, panel superior). Adicionalmente, se detectó un ión con una m/z 62 Dalton más alta que la del péptido K15I (Figura 10, asterisco) compatible con un aducto molecular del ión Cu<sup>++</sup>. También se encontraron aductos de Na<sup>+</sup> y K<sup>+</sup> de diferentes péptidos en algunos experimentos (Figura 10, asterisco). A menudo también se encontraron picos minoritarios con una m/z menor en 16-36 Dalton respecto al péptido K15I (Figura 10, flechas) debido tal vez a la pérdida neutra de grupos en los péptidos bajo las condiciones de absorción/ionización usadas en espectrometría de masas. Después de sólo 5 segundos en presencia de enzima se detectaron los productos I14I y R13I (Figura 10).

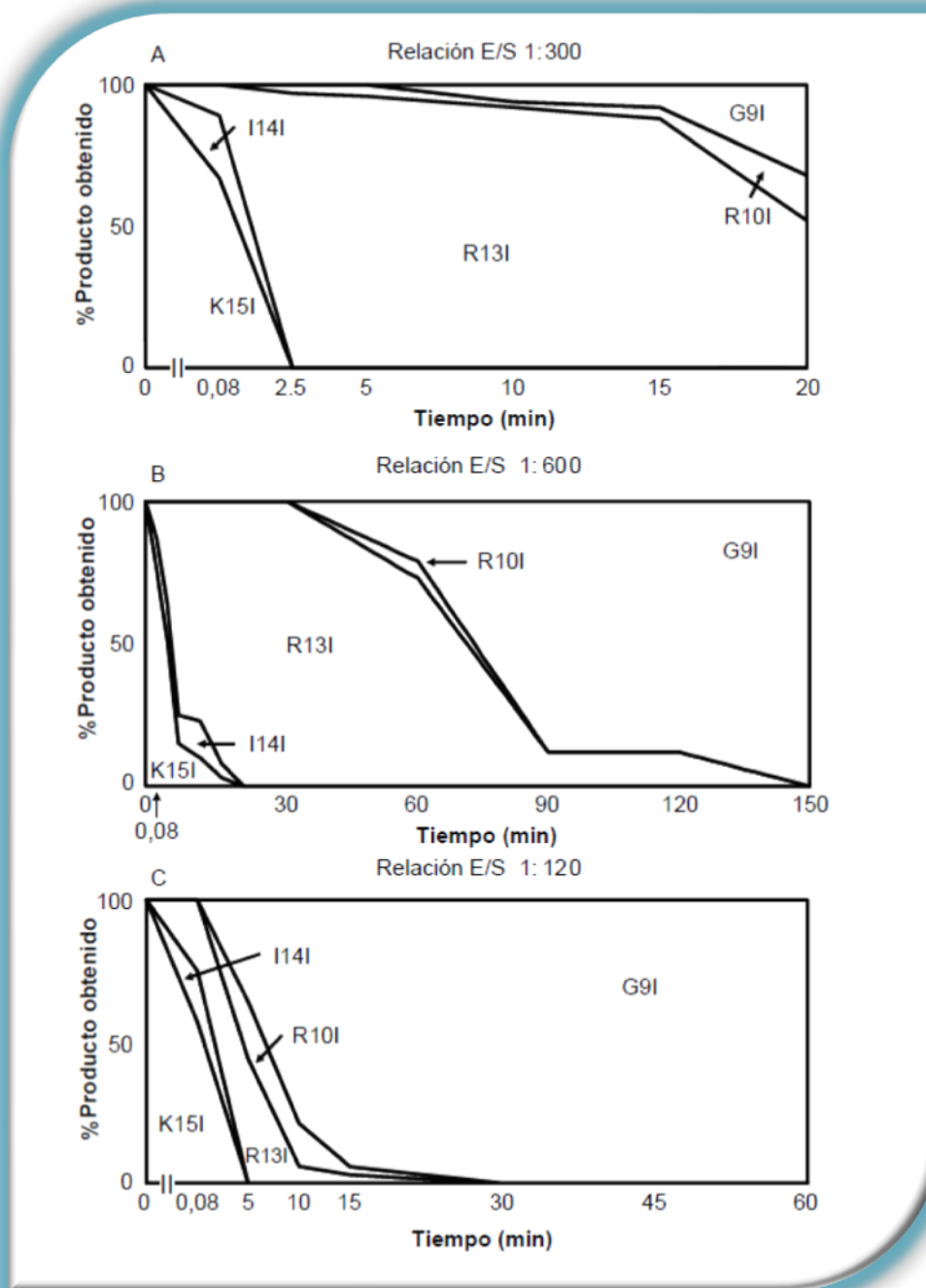
Después de 5 minutos todo el sustrato se transformó en el péptido de 13 aminoácidos, R13I; detectándose también pequeñas trazas de R10I. Cinco minutos más tarde, trazas del péptido más corto G9I también fueron detectadas en este análisis. Finalmente, tras 20 minutos de reacción enzimática se detectaron cantidades significativas de los productos R10I y G9I. No se encontraron valores de  $m/z$  correspondientes a los péptidos I12I y Q11I. Para verificar la naturaleza de las especies detectadas por MALDI-TOF y confirmar sus respectivas secuencias se realizaron análisis de fragmentación MS/MS con el sustrato y los cuatro productos peptídicos recortados (I14I, R13I, R10I y G9I). La interpretación de los distintos espectros de fragmentación permitió identificar inequívocamente los cinco péptidos con los correspondientes iones moleculares detectados por análisis de MALDI-TOF.



**Figura 10. Análisis por MALDI-MS de la reacción enzimática del péptido sintético soluble K15I digerido con ERAAP recombinante purificada.**

El sustrato K15I se digirió con ERAAP a una relación E/S de 1:300. Los análisis por MALDI-TOF de las digestiones del sustrato detectaron el sustrato K15I y diferentes péptidos recortados en el extremo N-terminal, así como varios aductos y pérdidas neutras de los péptidos K15I y R13I (marcados con asterisco y flecha, respectivamente). La relación  $m/z$  representada en el eje X abarca el rango entre 500-2000. La posición de la relación  $m/z$  y la longitud de cada posible péptido recortado en su extremo N-terminal se indica con una flecha en la base de la figura.

Los resultados que se muestran en la figura 10 y otros puntos intermedios se resumen y representan en la figura 11A.



**Figura 11. Análisis por MALDI-MS de los productos generados en la digestión del K15I por ERAAP a distintas relaciones E/S.**

Los gráficos de áreas de las digestiones se realizaron a diferentes relaciones E/S. El péptido sintético K15I soluble se digirió con la enzima purificada ERAAP. Las intensidades obtenidas en el análisis mediante MALDI-TOF para todos los péptidos se sumaron, se llevaron al 100% para cada tiempo y fueron representadas. Los diferentes productos detectados son nombrados en sus respectivas regiones. La relación E/S utilizada en cada experimento se indica en la parte superior del respectivo panel: A, 1:300; B, 1:600; y C, 1:120.

El sustrato K15I, fue rápidamente procesado por ERAAP para generar los productos de 14 y 13 aminoácidos. La Arg N-terminal del producto R13I fue bastante resistente al recorte, ya que el péptido R13I es la única especie molecular detectada entre 2,5 y 15 minutos. Los péptidos pequeños R10I y G9I aparecían a partir de los 5-10 minutos de reacción y son relevantes en la mezcla de reacción a los 20 minutos. En el análisis no se detectaron los intermediarios I12I y Q11I. Esto indica que después del recorte de R13I ambos péptidos deben recortarse muy rápidamente. Para estudiar con más detalle esta actividad enzimática se realizaron experimentos similares a los mostrados en la figura 11A, aumentando el tiempo de reacción y disminuyendo la concentración enzimática. Como se muestra en la figura 11B, el sustrato K15I fue detectado durante más tiempo al disminuir la concentración de enzima. Los péptidos I14I y R13I se generaron y procesaron muy rápidamente como indica la figura 10. Durante gran parte del tiempo de reacción R13I es el principal producto detectado. Tras una hora aparecieron en la mezcla de reacción los péptidos R10I y G9I y finalmente todo el sustrato se recortó al producto de 9 aminoácidos, G9I. Incluso con una reacción más lenta los péptidos intermediarios entre R13I y R10I no fueron detectados indicando su rápida conversión al péptido R10I. Péptidos más cortos que G9I no se detectaron en ningún momento. Para confirmar este punto se realizó una nueva reacción enzimática con mayores cantidades de ERAAP. En la figura 11C se observa que los productos recortados aparecían de manera similar a los experimentos anteriores con la única diferencia de que al ser la velocidad de reacción mayor, todo el sustrato fue recortado al producto final G9I después de tan sólo 15 min de reacción. La reacción no mostro ningún cambio después de 30 min y péptidos más pequeños que el nonámero no fueron detectados en ningún momento.

Para excluir la posibilidad que la no detección de intermediarios como I12I y Q11I y de los péptidos más pequeños como P8I y G7I se debiera a una diferente eficiencia en la ionización en lugar de la falta de productos recortados los péptidos comprendidos entre 7 y 15 aminoácidos se titularon y analizaron por espectrometría de masas MALDI-TOF. En el rango estudiado (entre 100 pmol y 1 $\mu$ mol) no se encontraron diferencias de detección de todos estos péptidos N-extendidos. Probablemente ello era debido a que son un conjunto de péptidos con idéntica región C-terminal y por tanto sus propiedades de ionización pueden ser muy similares.

## **2. — La molécula H-2 L<sup>d</sup> protege a ligandos N-extendidos del recorte in vitro por parte de la aminopeptidasa ERAAP —**

Para estudiar si el péptido K15I podría ser recortado asociado a su molécula de MHC-I presentadora se utilizó el complejo plegado, K15I- H-2 L<sup>d</sup> como posible sustrato de ERAAP. Como se muestra en la tabla I panel superior incluso a relaciones E/S altas (diez veces más alta que la cantidad de enzima utilizada en el experimento descrito en la figura 10 no se observó ni la desaparición del sustrato ni tampoco la detección de productos de recorte alguno. Como control de la actividad de ERAAP se llevaron a cabo experimentos en paralelo con el péptido K15I soluble (Tabla I).



En este caso, con una cantidad cinco veces menor de enzima que en la condición del complejo, se detectó una sustancial desaparición del péptido K15I y una complementaria aparición de productos de recorte N-terminal. Para descartar la posibilidad que la ausencia del recorte de ERAAP se debiera a efectos inhibitorios inespecíficos de algún componente desconocido en la preparación del complejo péptido-MHC, la mezcla de sustratos soluble y formando complejos del péptido K15I se incubó en presencia de la enzima de ratón. Como se muestra en la *tabla I*, se encontró un recorte eficiente del péptido K15I soluble por parte de ERAAP. Además se detectaron cantidades residuales de K15I (3%) compatibles con el total de la cantidad del complejo K15I-L<sup>d</sup> incubado en la mezcla de reacción. Más tarde se procedió a liberar el péptido K15I del complejo para verificar su integridad mediante desnaturalización del mismo a pH 2. Tras su posterior equilibrado a pH 7 se incubó con ERAAP. En estas condiciones se encontró una tasa similar de recorte a la observada con el péptido K15I soluble (Tabla I).

**Tabla I**

**Comparación del recorte producido por ERAAP del péptido K15I soluble y/o unido a MHC clase I**

Tiempo (min)	G9I	R10I	R13I	I14I	K15I	Sustrato <sup>a</sup>	L <sup>d</sup> -Pept	Enzima
							sPept <sup>b</sup>	Sustrato <sup>c</sup>
0	ND <sup>d</sup>	ND	ND	ND	100	L <sup>d</sup> -K15I	-	1:60
15	ND	ND	ND	ND	100			
30	ND	ND	ND	ND	100			
60	ND	ND	ND	ND	100			
90	ND	ND	ND	ND	100			
0	ND	ND	ND	ND	100	sK15I	-	1:300
0,08	ND	ND	40	22	38			
5	4	11	45	17	23			
15	15	11	46	14	14			
0	ND	ND	ND	ND	100	L <sup>d</sup> -K15I + sK15I	4:96	1:300
0,08	ND	ND	36	26	38			
5	5	8	84	ND	3			
15	41	18	38	ND	3			
0	ND	ND	ND	ND	100	dL <sup>d</sup> -K15I	-	1:300
0,08	ND	ND	33	24	43			
5	5	30	49	13	3			

<sup>a</sup> Sustrato utilizado: K15I unido a L<sup>d</sup> (L<sup>d</sup>-K15I), complejo L<sup>d</sup>-K15I desnaturalizado (dL<sup>d</sup>-K15I) y péptido soluble (sK15I).

<sup>b</sup> L<sup>d</sup>-péptido/ péptido soluble en relación molar.

<sup>c</sup> Enzima/sustrato en relación molar

<sup>d</sup> ND, péptidos no detectados incluyendo Q11I y I12I.

Como control adicional, se realizaron incubaciones del péptido R13I soluble o unido a H-2L<sup>d</sup> en las mismas condiciones que fueron usadas con el sustrato K15I (Tabla I). Los resultados obtenidos mostraron recorte del péptido soluble pero no asociado a MHC (Tabla II). En conjunto todos estos datos excluyen cualquier efecto inhibitorio sobre la actividad de ERAAP de algún componente de la mezcla del complejo Ld-K15I.

**Tabla II**

**Comparación del recorte producido por ERAAP del péptido R13I soluble y/o unido a MHC clase I**

Tiempo (min)	G9I	R10I	R13I	I14I	K15I	Sustrato <sup>a</sup>	L <sup>d</sup> -Pept	Enzima
							sPept <sup>b</sup>	Sustrato <sup>c</sup>
0	ND	ND	100	-	-			
30	ND	ND	100	-	-	L <sup>d</sup> -R13I	-	1:60
90	ND	ND	100	-	-			
0	ND	ND	100	-	-			
0,08	ND	7	94	-	-	sR13I	-	1:300
30	10	10	80	-	-			
60	24	12	64	-	-			
90	75	16	9	-	-			

<sup>a</sup> Sustrato utilizado: R13I unido a L<sup>d</sup> (L<sup>d</sup>-R13I) y el péptido soluble (sR13I).

<sup>b</sup> L<sup>d</sup>-péptido/ péptido soluble en relación molar

<sup>c</sup> Enzima/sustrato en relación molar

<sup>d</sup> ND, péptidos no detectados incluyendo Q11I y I12I.

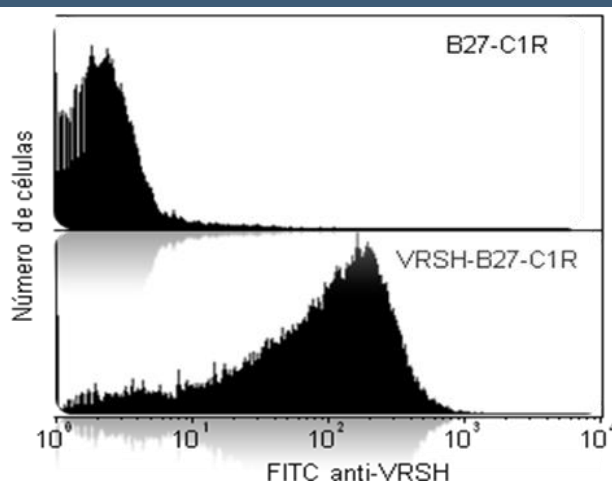
***B - Células HLA-Cw4 infectadas con el virus sincitial respiratorio presentan un ligando viral con interacciones a HLA no canónicas.***

***1.1 – Identificación de ligandos presentados por HLA procedentes de células humanas infectadas con VRSH –***

La estrategia utilizada en este estudio fue adaptada de la identificación de ligandos de HLA-B27 procedentes de transfectantes que expresaban proteínas bacterianas individuales (105) y (106). Inicialmente se aisló el repertorio de péptidos unidos a HLA procedentes tanto de células infectadas como su control de células no infectadas con VRSH. Después, ambos conjuntos de péptidos se fraccionaron por HPLC en carreras consecutivas bajo condiciones idénticas para reducir alteraciones en el patrón de elución de los péptidos. A continuación todas las fracciones recogidas se analizaron mediante espectrometría de masas MALDI-TOF. Cada espectro de una única fracción de HPLC procedente de células infectadas se comparó con la fracción correlativa (i), las dos previas (i-1 e i-2) y las dos fracciones siguientes (i+1 e i+2) del eluido de las células sin infectar. Esta técnica permite la selección de péptidos encontrados sólo en células infectadas por VRSH. Posteriormente, el correspondiente espectro de fragmentación de cada péptido se obtuvo mediante espectrometría de masas en el sistema ESI-IT. El análisis de dichos espectros de fragmentación mediante herramientas bioinformáticas permitió posteriormente la asignación de las secuencias peptídicas. Dichas secuencias se validaron por comparación del correspondiente espectro sintético con el obtenido experimentalmente.

***1.2 – Detección de un único ligando viral presentado diferencialmente por HLA en células infectadas con VRSH –***

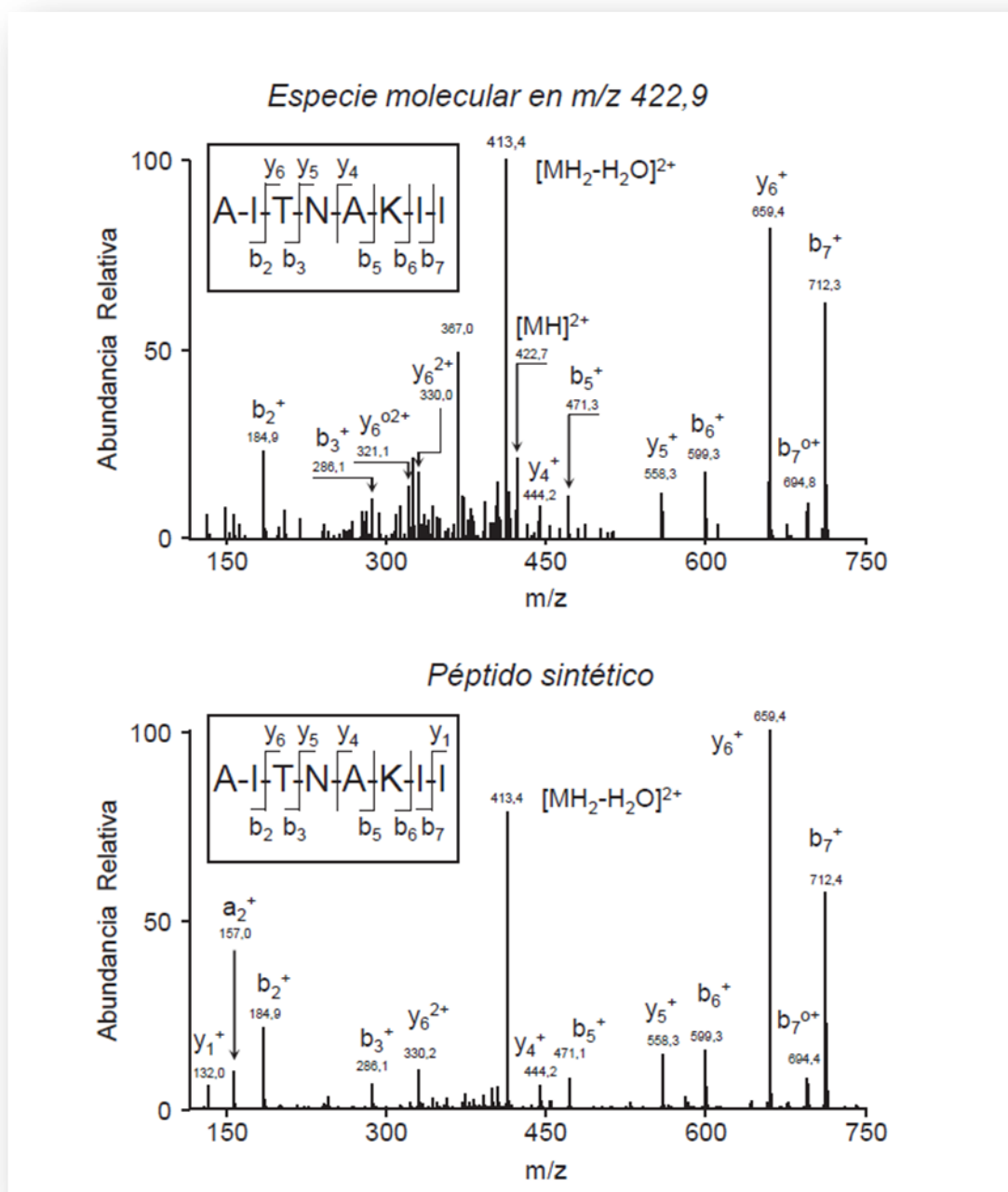
Como punto de partida, se utilizaron células B27-C1R que fueron incubadas con VRSH de la cepa Long y la presencia de proteínas virales en las células B27-C1R fue estudiada a diferentes tiempos mediante citometría de flujo. Los resultados mostrados en la figura 12 indicaban que tras 2 semanas de cultivo, la línea celular transfectante incubada con el virus, expresaba las proteínas F y/o G de VRSH a diferencia de la línea celular control. A tiempos más largos tras la infección también se obtuvieron resultados similares. Por tanto, se obtuvo una línea celular HLA-B27 persistentemente infectada por VRSH de manera análoga a la previamente descrita en células B humanas transformadas con el virus Epstein-Barr (118).



**Figura 12. Infección persistente de la línea celular B27-C1R por VRSH.**

Células B27-C1R fueron incubadas durante 2 h a 37 °C con VRSH de la cepa Long a una *moi* de 2 ufp/célula. Posteriormente se mantuvieron en cultivo durante 2 semanas y se marcaron con un anticuerpo policlonal FITC-anti-VRSH que reconoce las proteínas F y G de VRSH. Las muestras se analizaron por FACS (células B27-C1R sin infectar usadas como control negativo, panel superior y células B27-C1R infectadas con VRSH, panel inferior).

Después, sus equivalentes peptídicos unidos a HLA fueron aislados tanto de  $2 \times 10^9$  células B27-C1R infectadas como de no infectadas con dicho virus. Posteriormente se llevó a cabo un análisis comparativo mediante MALDI-TOF. Se detectaron 22 picos en diferentes fracciones de HPLC en células infectadas ausentes en las fracciones de células control y que posteriormente fueron analizadas por espectrometría de masas ESI-IT. Sólo el ión con una relación  $m/z$  de 422,9 fue asignado a la secuencia viral AITNAKII, correspondiente a los residuos 188-195 de la proteína de la matriz de VRSH (Figura 13, panel superior). El análisis del espectro de fragmentación de este ión frente a la base de datos del proteoma humano completo no reveló identidad con ninguna proteína humana, confirmando así el origen viral del péptido. La asignación teórica de esta secuencia se confirmó por comparación con el espectro de fragmentación MS/MS del correspondiente péptido sintético (Figura 13, panel inferior). Estos resultados indican que un ligando de VRSH es procesado y presentado endógenamente por una molécula de HLA de clase I en células B27-C1R.

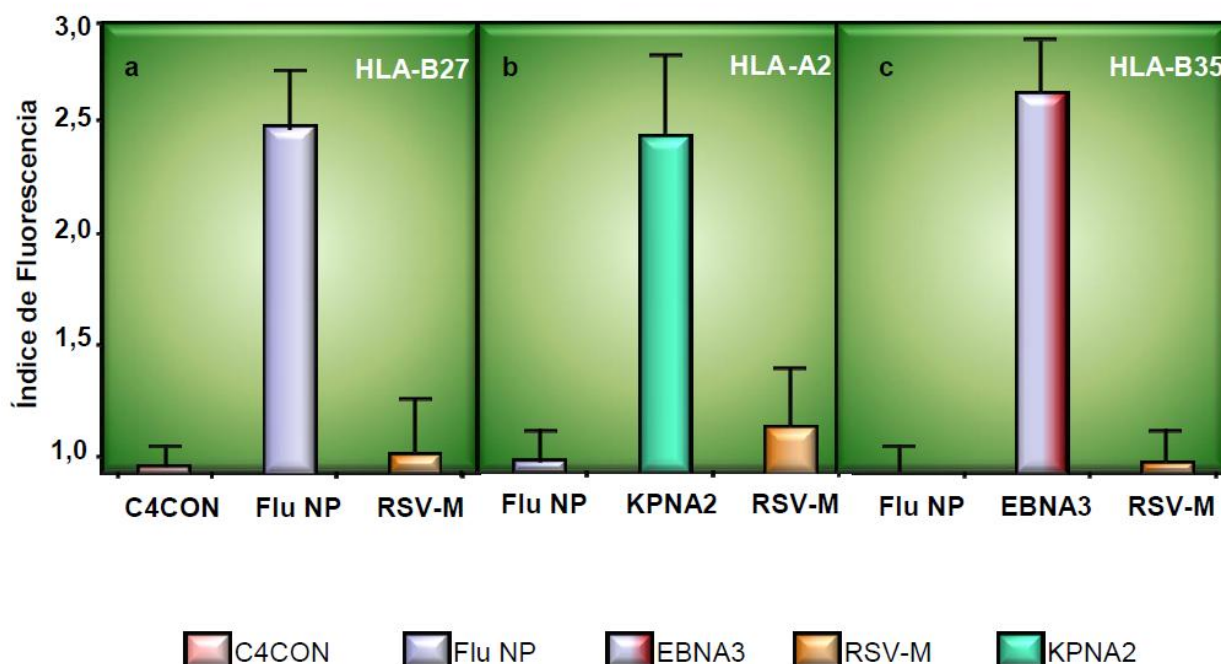


**Figura 13.** Identificación mediante espectrometría de masas del ligando M188-195 obtenido del extracto de células infectadas.

Espectro de fragmentación MS/MS con m/z 422,9 obtenido de un extracto de células B27-C1R infectadas con VRSH (panel superior) y su correspondiente péptido sintético (panel inferior). El eje vertical representa la abundancia relativa del ión parental y cada uno de los iones detectados en la fragmentación. La secuencia deducida procedente de los fragmentos asignados se indica en el cuadro superior izquierdo de cada respectivo panel.

### 1.3 — El péptido M188-195 de VRSH no es un ligando canónico de HLA-Cw4 —

Siguiendo una estrategia similar a la utilizada en este estudio, se han podido identificar varios cientos de ligandos de HLA-B27 por inmunoprecipitación con el anticuerpo monoclonal W6/32 en células B27-C1R (base de datos SYFPEITHI : <http://www.syfpeithi.de>) (119). Esta molécula de MHC de clase I une péptidos con un residuo de Arg en posición 2 y residuos básicos, alifáticos ó aromáticos en posición C-terminal (120). El ligando 188-195 de la matriz de VRSH con secuencia AITNAKII, identificado en la figura 13 no presenta los motivos de anclaje canónicos de HLA-B27. Por tanto, una posibilidad podría ser que fuera un ligando inusual restringido por dicha molécula de HLA-B27. Para comprobar esta hipótesis, se llevaron a cabo ensayos de estabilización del complejo MHC/péptido en células RMA-S deficientes en TAP transfectadas con HLA-B27. La figura 14a muestra que al contrario de un ligando control de HLA-B27, el péptido NP del virus de la gripe, con el péptido 188-195 de la matriz de VRSH no se detectó inducción de complejos con HLA-B27. Por tanto este ligando viral no se une a HLA-B27.



**Figura 14. Ensayo de estabilización de HLA con el péptido sintético M188-195 de VRSH.**

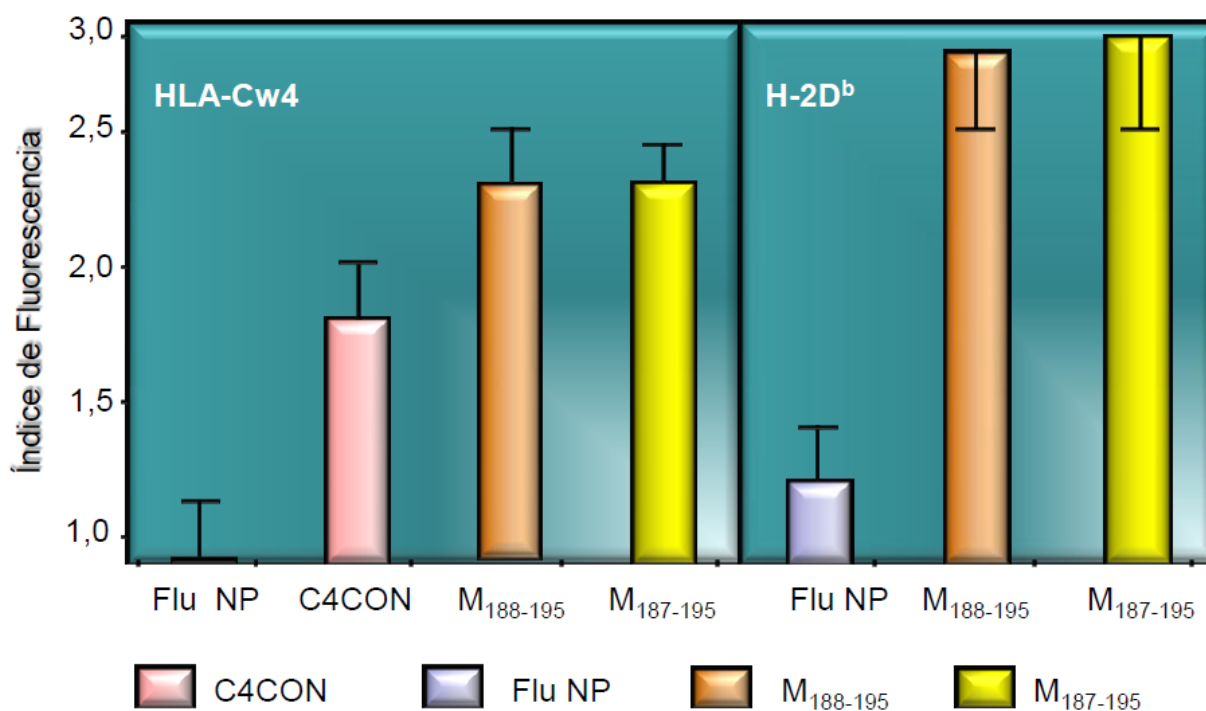
Medida por citometría de flujo de la estabilidad en la superficie celular de HLA-B27 (panel a), HLA-A2 (panel b), o HLA-B35 (panel c) en las células RMA-S transfectadas con cada una de estas moléculas de HLA de clase I. Los péptidos que se indican fueron utilizados a una concentración de 200  $\mu$ M. Los anticuerpos utilizados fueron los siguientes: ME1 (anti-HLA-B27, panel a), PA2.1 (anti-HLA-A2, panel b) y W6/32 (monomórfico anti-HLA-A,B,C, panel c). Los resultados calculados como IF  $\pm$  SD corresponden a la media de 2 a 4 experimentos independientes.

La línea celular C1R ha sido ampliamente utilizada como receptor de transfecciones en estudios funcionales sobre genes de MHC de clase I porque expresa cantidades muy reducidas de sus propias moléculas de HLA-A y -B, ya que procedía de células B transformadas con el EBV modificadas por varias rondas de mutagénesis y posterior inmunoselección con anticuerpos anti-HLA y complemento (87). Un posterior estudio demostraba que en estas células heterocigotas la región cromosómica que codificaba para HLA-A3, -Bw62, y -Cw3 estaba delecionada, mientras que la expresión de HLA-B35 y -Cw4 era débilmente positiva y que la expresión de HLA-A2 parecía ser negativa (88). Por tanto, se realizaron nuevos ensayos de estabilidad del complejo MHC/péptido utilizando células RMA-S deficientes en TAP, transfectadas con cada uno de los alelos de HLA de la línea celular parental C1R. No se detectó estabilización alguna tanto en células HLA-A2<sup>+</sup> (Figura 14b) como en células HLA-B35<sup>+</sup> (Figura 14c). Estos datos indican que el péptido AITNAKII no está restringido por estas moléculas de HLA.

Por el contrario, dicho ligando viral inducía un número similar de complejos HLA/péptido en superficie como el ligando de HLA-Cw4 previamente descrito, C4CON (Figura 15, panel izquierdo). El motivo de anclaje consenso para HLA-Cw4 es Tyr o Phe en la posición 2 del péptido (121) y (122). Por tanto, el octámero M188-195 es un ligando inusual de HLA-Cw4.

#### ***1.4 – Idéntica jerarquía de unión a MHC de clase I tanto humano como de ratón de dos péptidos virales relacionados –***

Previamente el nonámero M187-195 con secuencia NAITNAKII ha sido descrito como un epítipo reconocido por CTLs y restringido por H-2D<sup>b</sup> (123). Dicho ligando posee los motivos de anclaje para la molécula D<sup>b</sup> (9). Por lo tanto, 2 péptidos virales de diferentes longitudes que comparten el mismo núcleo antigénico y sólo difieren en el residuo N-terminal podrían ser presentados por las moléculas de HLA-Cw4 o H-2D<sup>b</sup> en sus respectivas células infectadas. Así, se procedió a estudiar la unión de ambos: octámero (AITNAKII) y nonámero (NAITNAKII) a estas dos moléculas de MHC de clase I. Los resultados obtenidos indicaron que ambos péptidos estabilizaban los complejos MHC-péptido en la superficie de células tanto positivas para HLA-Cw4 (Figura 15, panel izquierdo) como para H-2D<sup>b</sup> (Figura 15, panel derecho).

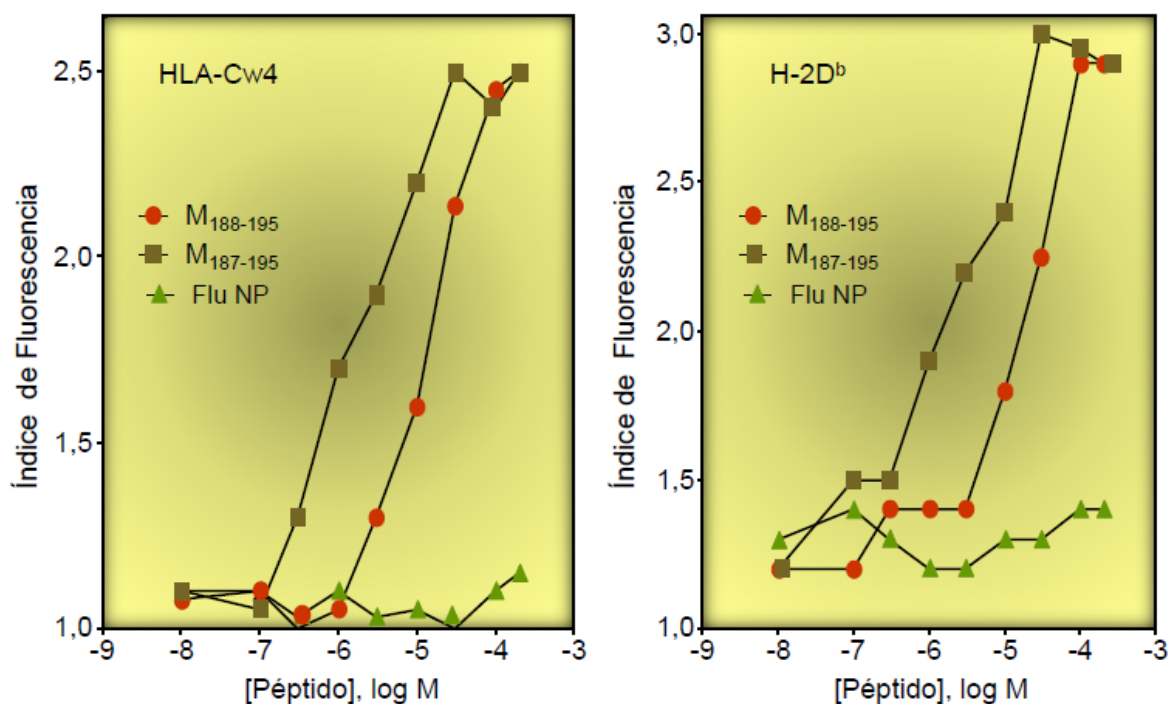


**Figura 15.** Ensayo estabilización de HLA con los péptidos sintéticos M188-195 y M187-195 de VRSH.

Medida por citometría de flujo de la estabilidad en la superficie celular de HLA-Cw4 (panel izquierdo), o H-2D<sup>b</sup> (panel derecho) en células RMA-S transfectadas con cada una de estas moléculas de clase I. Los péptidos indicados fueron utilizados a una concentración de 200  $\mu$ M. Los anticuerpos monoclonales utilizados fueron W6/32 (anti-HLA-A, -B, -C monomórfico, panel izquierdo) y 34-5-8S (anti-H-2D<sup>b</sup>, panel derecho).

Además, se evaluó la afinidad relativa a MHC de clase I de estos 2 péptidos, obteniéndose que ambos se encontraban dentro del rango común de afinidad definido para otros ligandos naturales (Figura 16). Así, el nonámero estabilizó las células HLA-Cw4 (Figura 16, panel izquierdo) y H-2D<sup>b</sup> (Figura 16, panel derecho) con una C<sub>50</sub> de  $1,5 \pm 1 \mu$ M y  $2 \pm 1 \mu$ M respectivamente. Además, el MHC-I en ambas líneas celulares se estabilizó alrededor de 10 veces menos eficientemente con el octámero (Figura 16) que con el nonámero pero todavía dentro del rango de ligandos óptimos de HLA. Sorprendentemente, tanto el octámero como el nonámero se unían eficientemente a HLA-Cw4 a pesar de carecer ambos, de motivos canónicos de anclaje para interactuar con la molécula presentadora humana. En resumen, los dos péptidos muestran patrones idénticos de unión a MHC tanto en células humanas como de ratón.





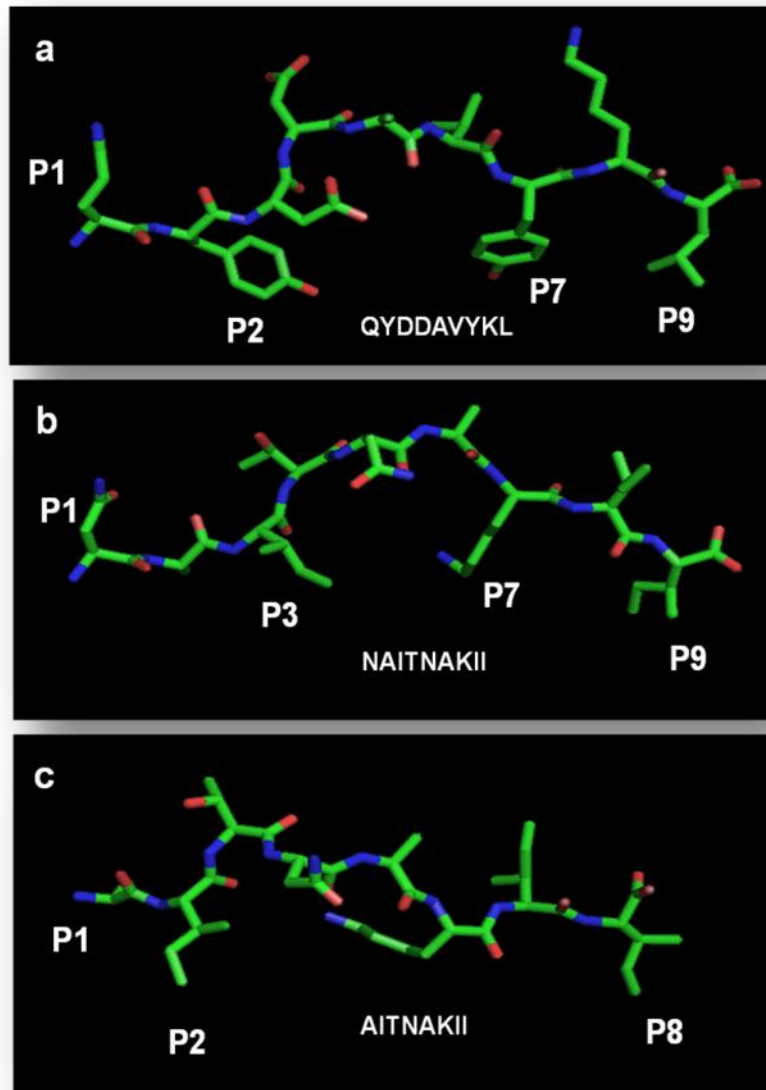
Péptido	$C_{50}$ ( $\mu$ M)	
	HLA-Cw4	H-2D <sup>b</sup>
RSV M <sub>188-195</sub>	16 ± 12	22 ± 8
RSV M <sub>187-195</sub>	1,5 ± 1	2 ± 1

Figura 16. Afinidad de unión al MHC de los péptidos sintéticos M188-195 y M187-195 de VRSH.

Medida por citometría de flujo de la estabilidad en la superficie de células que expresan HLA-Cw4 (panel izquierdo), ó H-2D<sup>b</sup> (panel derecho), de los péptidos sintéticos de VSRH M188-195 (círculos) M187-195 (cuadrados) y FLU NP (control negativo, triángulos). Los datos calculados como  $C_{50} \pm SD$  corresponden a medias de 3-5 experimentos independientes.

### 1.5 – Diferente conformación de unión a la molécula de HLA-Cw4 del octámero y del nonámero de VRSH –

Únicamente se ha descrito una estructura cristalina de HLA-Cw4 asociada con el péptido C4CON (QYDDAVYKL) (124). Este péptido se encuentra anclado a 4 subcavidades específicas del sitio de unión antigénico de HLA-Cw4. Así, la subcavidad A interacciona con el grupo aminoterminal y con la cadena lateral del residuo de Gln de la posición 1 (Figura 17a).



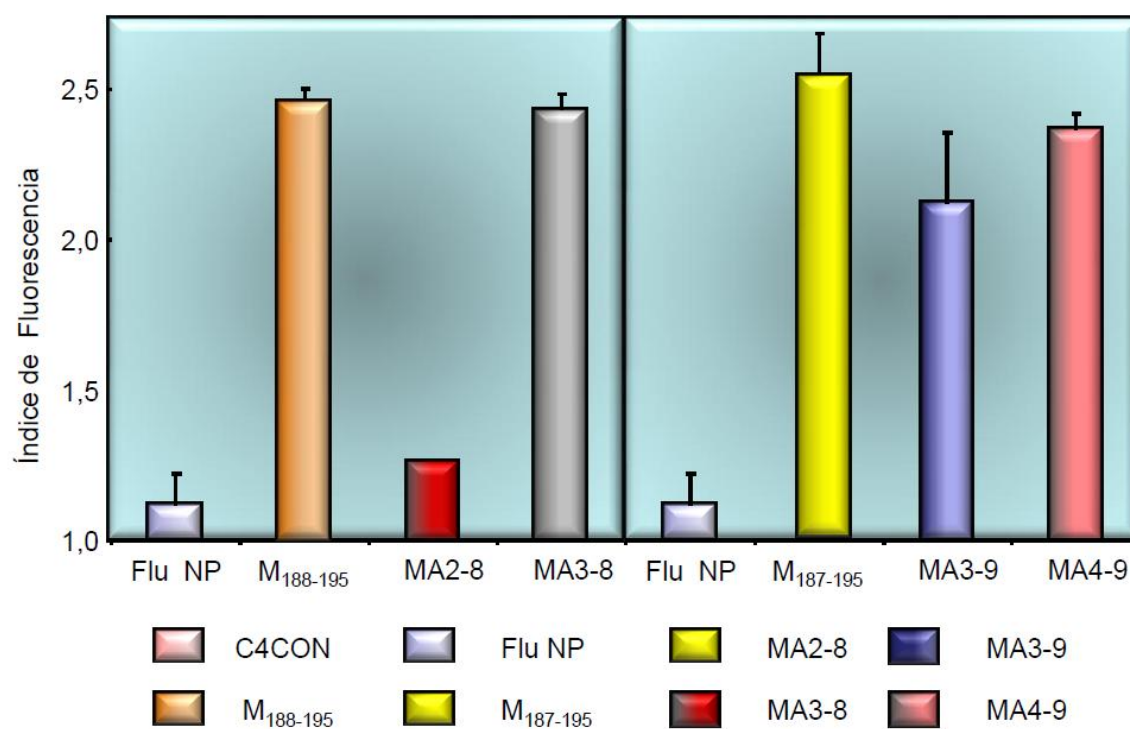
**Figura 17. Modelización de las conformaciones de unión a HLA-Cw4 de los péptidos C4CON (QYDDAVYKL), VRSH M187-195 (NAITNAKII) y M188-195 (AITNAKII)**

El esqueleto atómico de los péptidos indicados que se unen a HLA-Cw4 se muestra en línea gruesa (Panel a, QYDDAVYKL; panel b, NAITNAKII; y panel de c: AITNAKII). Los átomos son representados por la siguiente combinación de colores: nitrógeno, azul; oxígeno, rojo y carbono, verde. Los residuos que interactúan con las diferentes subcavidades se encuentran indicados como Px. HLA-Cw4 no se muestra en la representación. La figura se preparó utilizando el programa PyMOL.

La subcavidad B interacciona con el residuo de Tyr de la posición 2. Además, la molécula HLA-Cw4 presenta una subcavidad E localizada en el lateral de la hélice  $\alpha 1$ , formada principalmente por

residuos de la hélice  $\alpha 1$  y lámina  $\beta$  que unen la cadena lateral de la Tyr P7 del péptido. Por último, la subcavidad F forma el límite carboxiloterminar del sitio de unión antigénica, encontrándose parcialmente ocupada por la cadena lateral de la Leu en posición 9 del péptido. Entonces, la modelización tanto del octámero como del nonámero de VRSH unidos a HLA-Cw4 se realizó en base a la estructura de rayos X existente del péptido QYDDAVYKL unido a esta molécula de clase I (Figura 17a). La Ile carboxiterminar de ambos péptidos virales interaccionaba con la subcavidad C-terminal F, tal y como lo hacía la Leu en posición 9 del péptido QYDDAVYKL (Figuras 17b y c). En el nonámero de VRSH, la Ile en posición 3 y la Lys en posición 7 debían de estar acomodadas dentro de las subcavidades B y E respectivamente, con los residuos 4-6 y 8 sobresaliendo del surco de unión (Figura 17b). En este nonámero viral, la existencia de Asn en P1 permitía recuperar la interacción del grupo amida de la Gln en P1 del péptido C4CON con la molécula de HLA-Cw4, como se muestra en los datos cristalográficos de la figura 17a. La cadena lateral más corta de la Asn en comparación con la Gln, permite la inclusión del pequeño residuo de Ala en la posición 2, con muy poca variación en la conformación final del péptido. Al contrario, en el octámero el grupo amida terminal de la Ala en P1 interacciona de forma idéntica a los grupos equivalentes tanto de la Gln P1 en el péptido QYDDAVYKL como de la Asn P1 del nonámero. Las interacciones del grupo amida terminal y de la cadena lateral de C $\Omega$  con la molécula de HLA extienden al péptido octamérico y, entonces tanto la Ile en P2 como la Lys en P6 no se pueden acomodar como en el péptido nonamérico. Estas pérdidas en las interacciones del octámero con la molécula de HLA podrían explicar las diferencias entre los dos péptidos encontradas en los ensayos de estabilización de MHC (Figura 16).

Para demostrar que los péptidos virales de 8 y 9 residuos se encuentran unidos de forma diferente a la molécula de HLA-Cw4 se llevaron a cabo nuevos ensayos de estabilidad del complejo MHC/péptido con péptidos análogos a los de la Matriz de VRSH pero con sustituciones de Ala en diferentes posiciones. La interacción del octámero con el MHC no se producía (Figura 18, panel izquierdo) cuando se intercambiaba la Ile en la posición 2, que sirve como motivo de anclaje, por un residuo de Ala. Por el contrario, la sustitución Ala  $\rightarrow$  Ile en la posición de anclaje P3 del nonámero, no alteraba la unión del péptido a MHC (Figura 18, panel derecho). Además, la sustitución Ala  $\rightarrow$  Thr en posición P3 para el octámero (Figura 18, panel izquierdo) y en posición P4 para el nonámero (Figura 18, panel derecho), tampoco modificó la estabilización de los complejos de MHC. Las interacciones adicionales con el HLA de Asn en P1 y Lys en P7 presentes en el nonámero pero ausentes en el octámero como sugería la modelización de la figura 17, podría compensar la pérdida de interacción de la Ile P3 cuando se sustituye por Ala y explicar así la estabilización del nonámero A3-9 (Ala  $\rightarrow$  Ile).



**Figura 18. Ensayo de estabilidad de HLA con análogos monosustituidos de Ala de los péptidos sintéticos M188-195 y M187-195.**

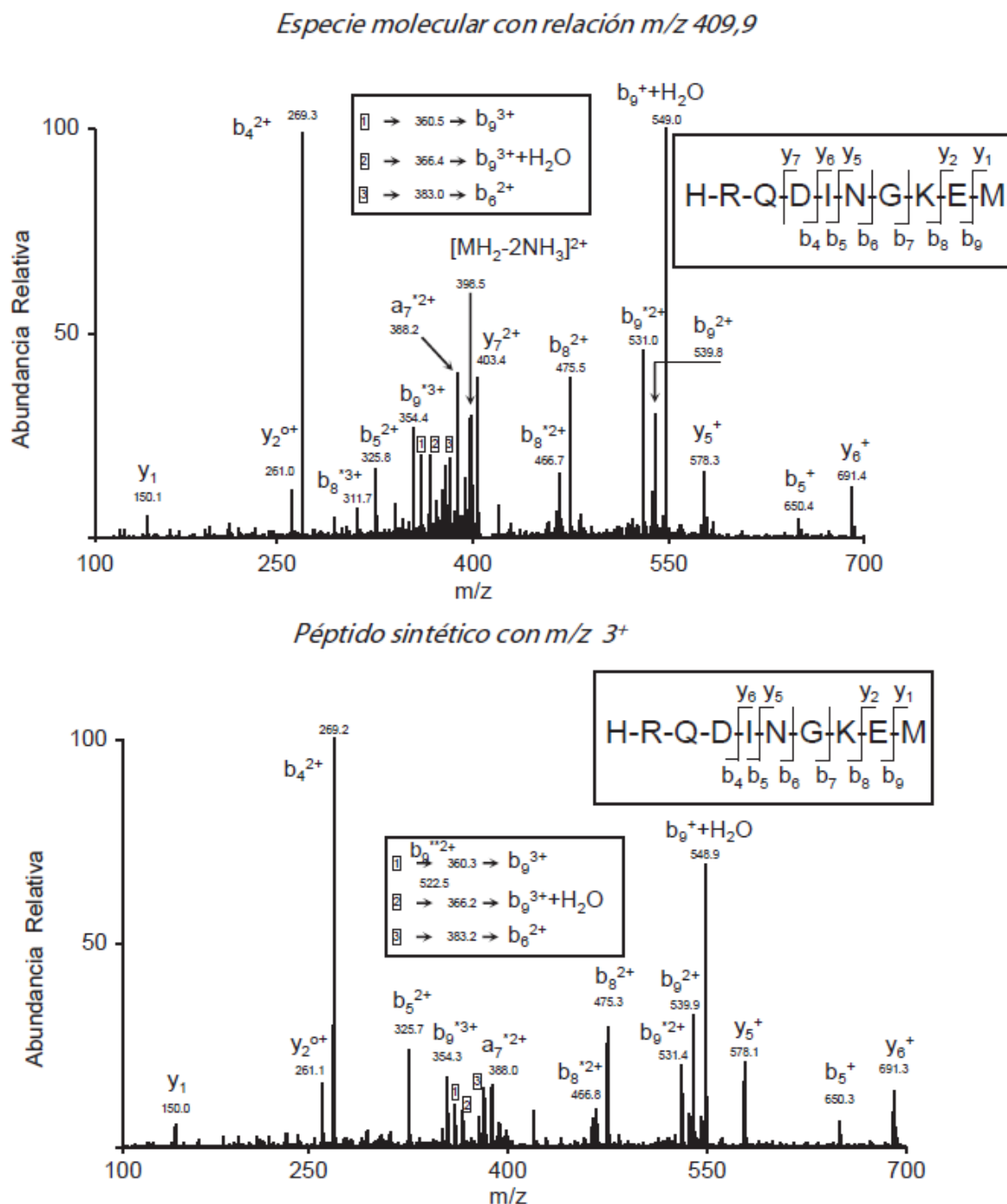
Medida por citometría de flujo de la estabilidad de HLA-Cw4 en la superficie celular de transfectantes RMA-S. Los péptidos indicados se utilizaron a una concentración de 200  $\mu$ M. El anticuerpo utilizado en los ensayos fue W6/32 (anti-HLA-A, -B, -C monomérico). Los datos calculados al igual que en la figura 3 son la media de 3 experimentos independientes.

*C- Ligandos virales presentados por HLA-B27 en células infectadas por el virus respiratorio sincitial humano.*

*1 – Identificación de nueve ligandos virales de HLA en células infectadas por VRSH –*

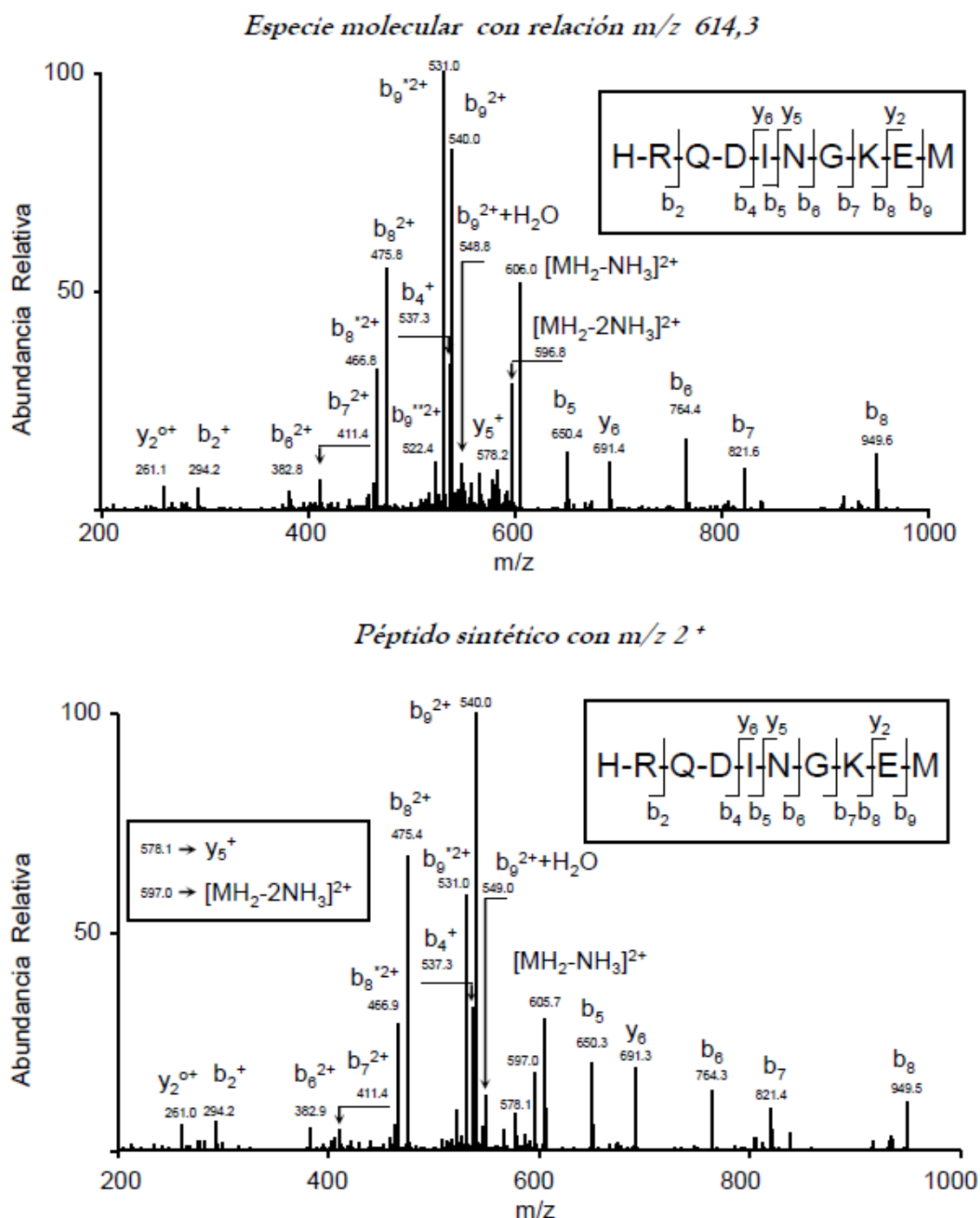
Una vez puesta a punto la técnica anteriormente con la identificación del ligando viral AITNAKII se procedió a infectar  $40 \times 10^{10}$  células con VRSH y se usó una cantidad similar de células no infectadas como control. Se aislaron el conjunto de péptidos unidos a HLA tanto de dichas células infectadas como de sus equivalentes en células no infectadas. Estas mezclas de péptidos se estudiaron posteriormente en un sistema de HPLC en fase reversa unido directamente a un espectrómetro de masas. Esta modificación respecto a la puesta a punto previa, fue posible por la utilización de un espectrómetro de masas más avanzado que permitió simplificar el protocolo experimental, aumentando la resolución y la detección de las especies moleculares a fragmentar. Utilizando varias herramientas bioinformáticas descritas en materiales y métodos, 10 espectros de fragmentación presentes en el repertorio de péptidos presentados por las células infectadas con VRSH pero ausentes en las células control fueron asignados a secuencias peptídicas pertenecientes a proteínas de VRSH (Figuras 19-28). Además, la comparación de dichos espectros de fragmentación con la base de datos correspondiente al conjunto del proteoma humano no reveló ninguna homología con los fragmentos peptídicos pertenecientes a proteínas humanas, confirmándose así el origen viral de estos ligandos. Los espectros de fragmentación de dichas especies moleculares así como las secuencias peptídicas asignadas se representan en los paneles superiores del anexo de las Figuras 1-10. Virtualmente todos los iones detectados en dichos espectros MS/MS fueron asignados como iones de fragmentación de las secuencias tentativas propuestas (paneles superiores, Figuras 19-28). Estas asignaciones bioinformáticas fueron confirmadas con los espectros MS/MS de los correspondientes péptidos sintéticos (paneles inferiores, Figuras 19-28). La tabla III resume las características de los iones estudiados así como las secuencias virales identificadas.

En resumen estos resultados indicaban que un total de nueve ligandos de VRSH fueron procesados endógenamente y presentados en la línea celular infectada.



**Figura 19. Análisis por Espectrometría de masas del péptido sintético con secuencia HRQDINGKEM.**

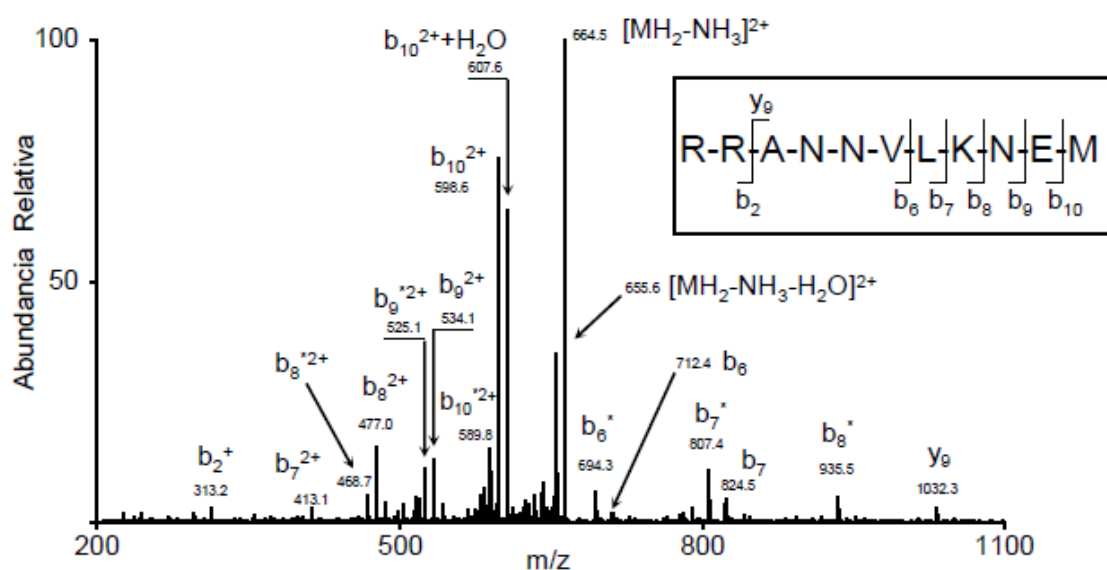
Espectro de fragmentación MS/MS obtenido en la trampa iónica del ión con una relación  $m/z$  de 409,9 el cual corresponde al ión molecular con carga triple del péptido sintético HRQDINGKEM. El eje vertical representa la abundancia relativa del ión parental y cada ión de fragmentación detectado. El eje horizontal corresponde a la relación  $m/z$  de los iones hijos detectados. En la parte superior derecha de cada panel podemos encontrar los iones generados en la fragmentación y su secuencia.



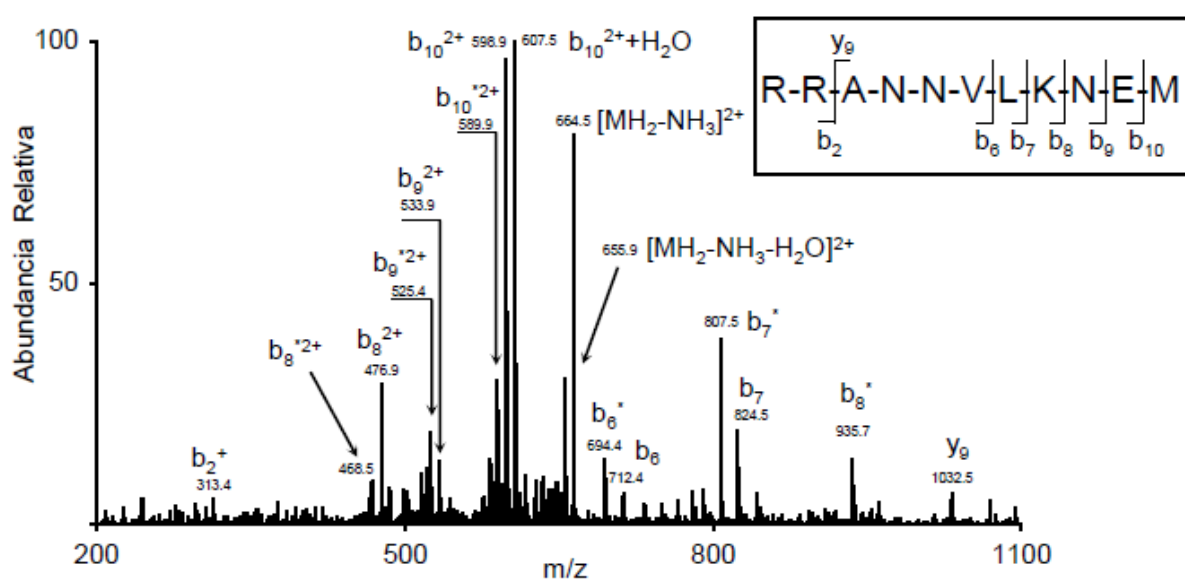
**Figura 20.** Análisis por Espectrometría de masas del péptido sintético con secuencia HRQDINGKEM.

Espectro de fragmentación MS/MS obtenido en la trampa iónica del ión con una relación  $m/z$  de 614,3 el cual corresponde al ión molecular con doble carga del péptido sintético HRQDINGKEM. El eje vertical representa la abundancia relativa del ión parental y cada ión de fragmentación detectado. El eje horizontal corresponde a la relación  $m/z$  de los iones hijos detectados. En la parte superior derecha de cada panel podemos encontrar los iones generados en la fragmentación y su secuencia.

*Especie molecular con  $m/z$  672,9*



*Péptido sintético*

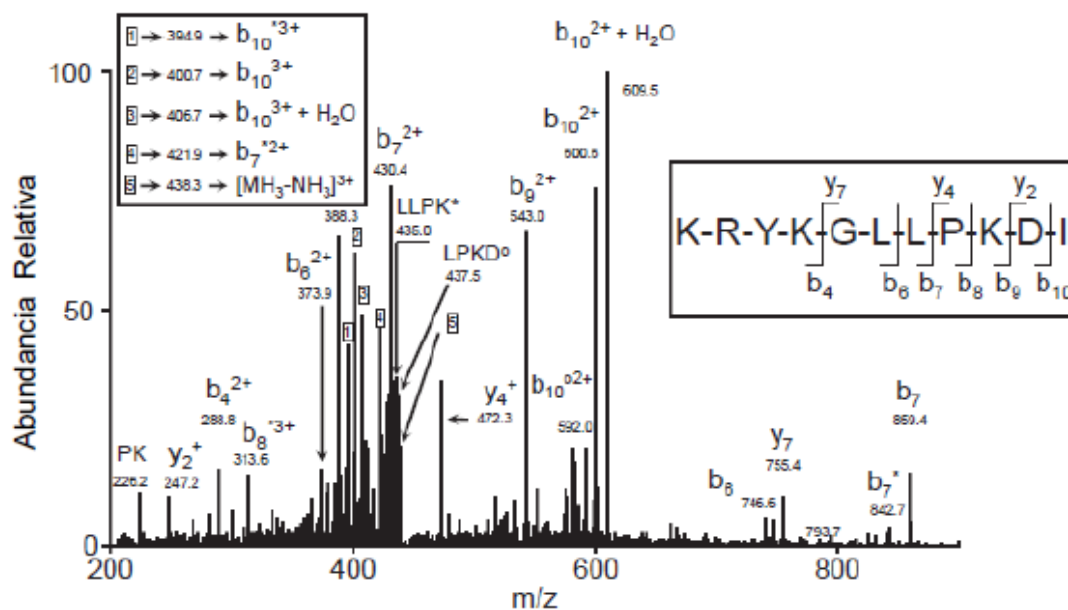


**Figura 21.** Identificación por Espectrometría de masas del ligando N 184-194 en un extracto de células infectadas.

Espectro de fragmentación MS/MS obtenido en la trampa iónica de los iones con una relación  $m/z$  de 672,9 procedente de un extracto de células B27-C1R infectadas con VRSH (panel superior) y el correspondiente péptido sintético (panel inferior). El eje vertical representa la abundancia relativa del ión parental y cada ión de fragmentación detectado. En la parte superior derecha de cada panel podemos encontrar los iones generados en la fragmentación y su secuencia.



Especie molecular con  $m/z$  444,3



Péptido sintético

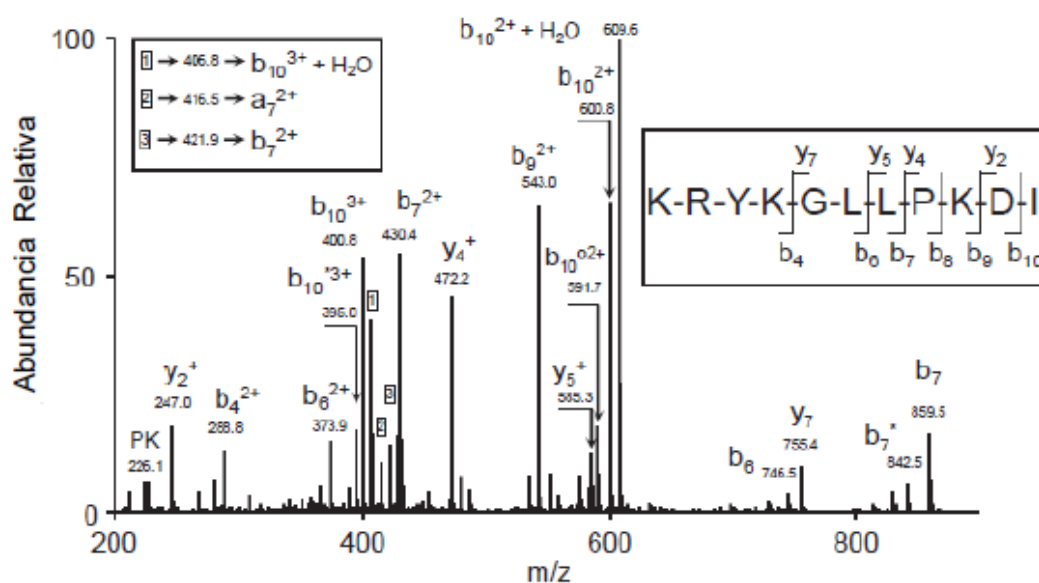
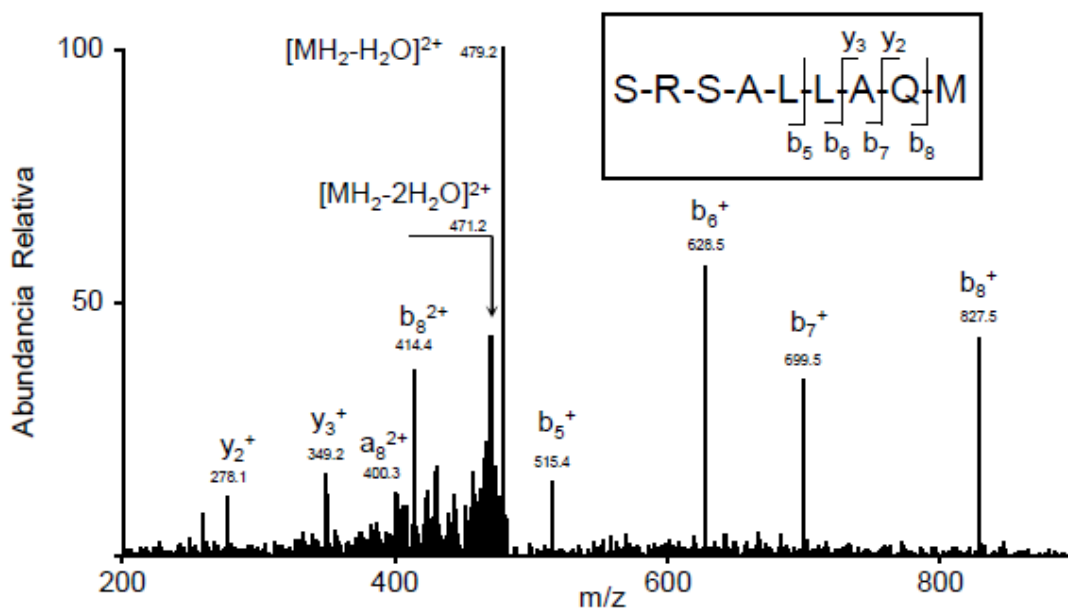


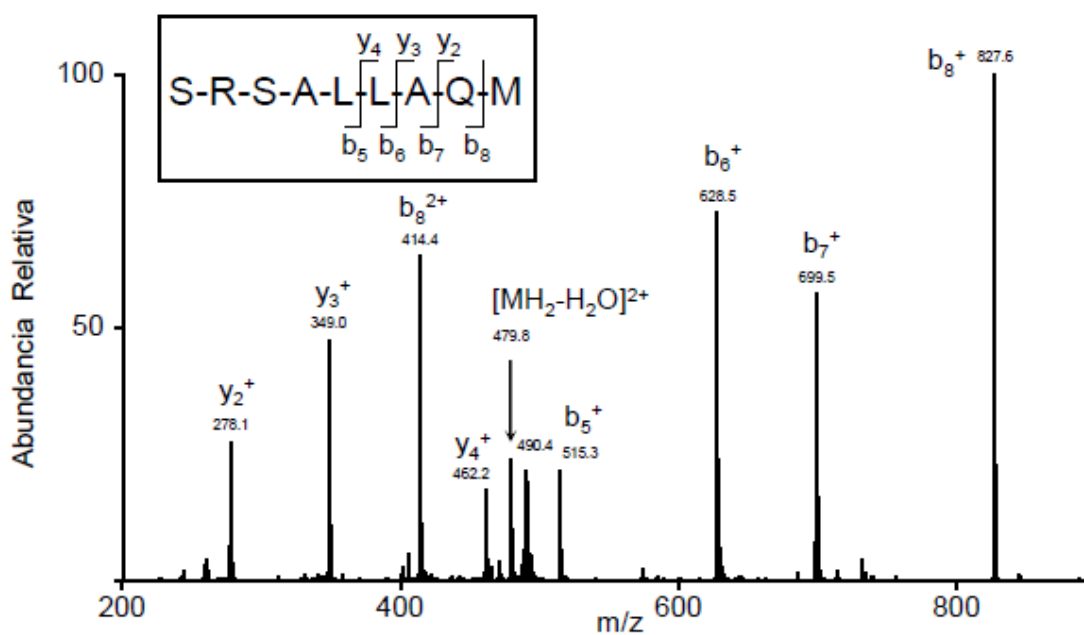
Figura 22. Identificación por Espectrometría de masas del ligando N 195-202 en un extracto de células infectadas.

Espectro de fragmentación MS/MS obtenido en la trampa iónica de los iones con una relación  $m/z$  de 444,3 procedente de un extracto de células B27-C1R infectadas con VRSH (panel superior) y el correspondiente péptido sintético (panel inferior). Los ejes representan los mismos datos que en la Figura

*Especie molecular con  $m/z$  488,8*



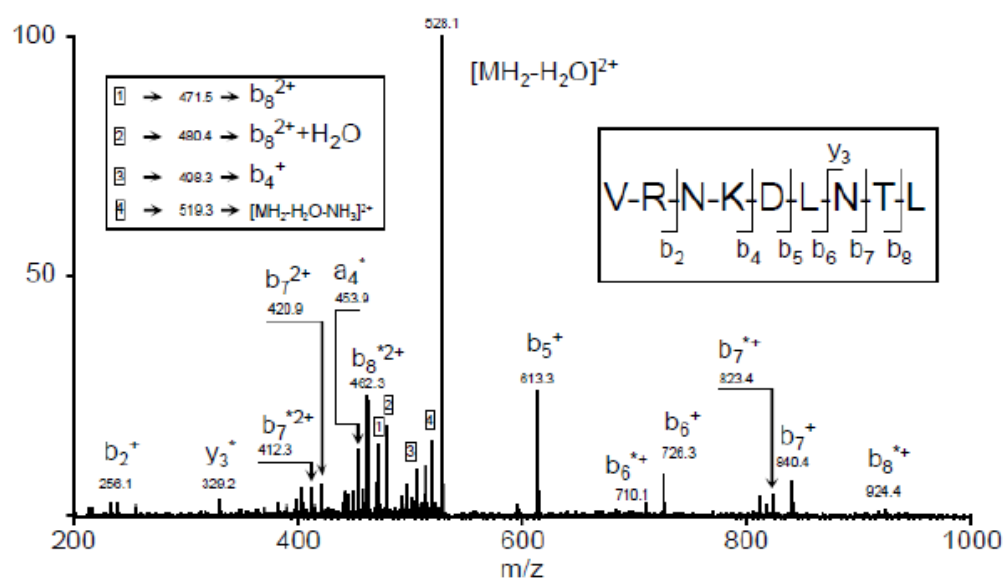
*Péptido sintético*



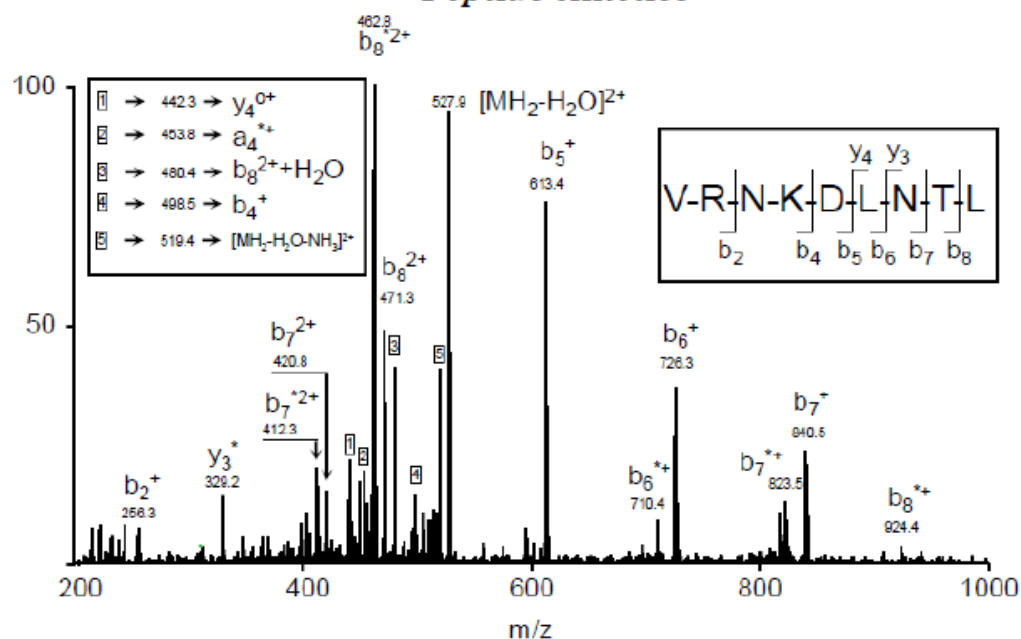
**Figura 23.** Identificación por Espectrometría de masas del ligando M 76-84 en un extracto de células infectadas.

Espectro de fragmentación MS/MS obtenido en la trampa iónica de los iones con una relación  $m/z$  de 488,8 procedente de un extracto de células B27-C1R infectadas con VRSH (panel superior) y el correspondiente péptido sintético (panel inferior). Los ejes representan los mismos datos que en la Figura

### Especie molecular con $m/z$ 536,8



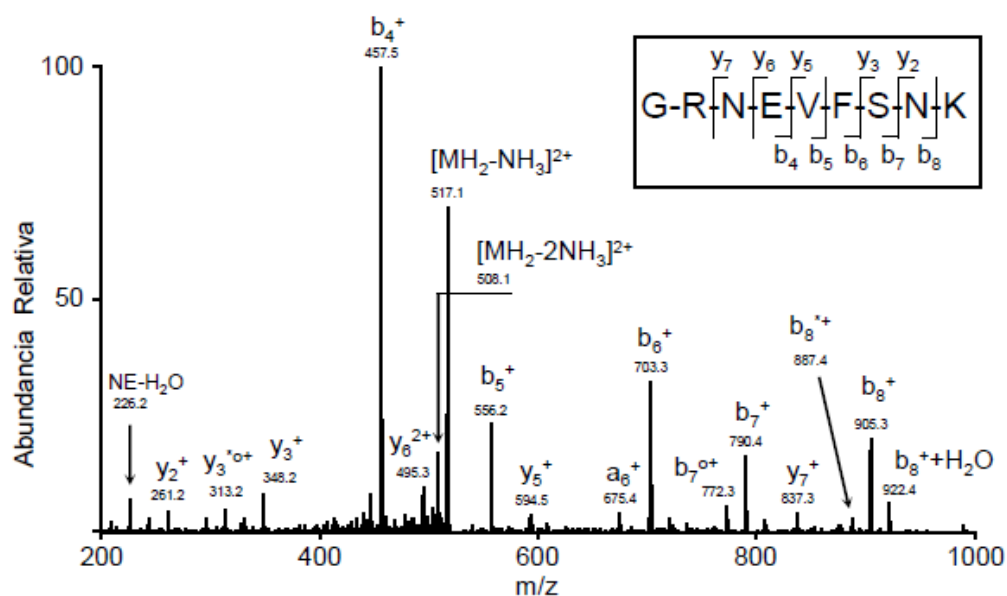
### Péptido sintético



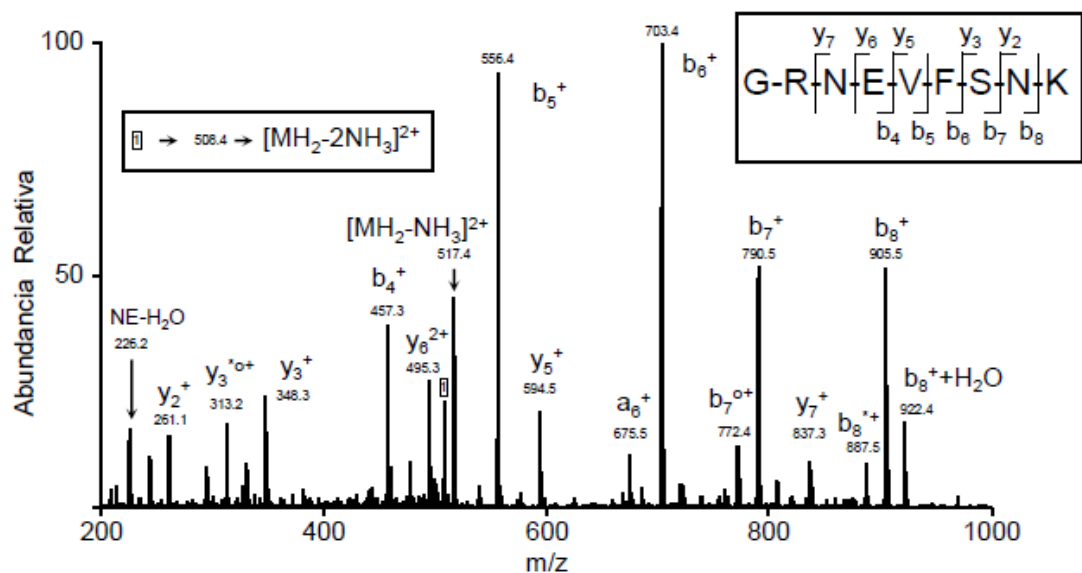
**Figura 24. Identificación por Espectrometría de masas del ligando M 169-177 en un extracto de células infectadas.**

Espectro de fragmentación MS/MS obtenido en la trampa iónica de los iones con una relación  $m/z$  de 536,8 procedente de un extracto de células B27-C1R infectadas con VRSH (panel superior) y el correspondiente péptido sintético (panel inferior). Los ejes representan los mismos datos que en la Figura

Especie molecular con  $m/z$  525,8

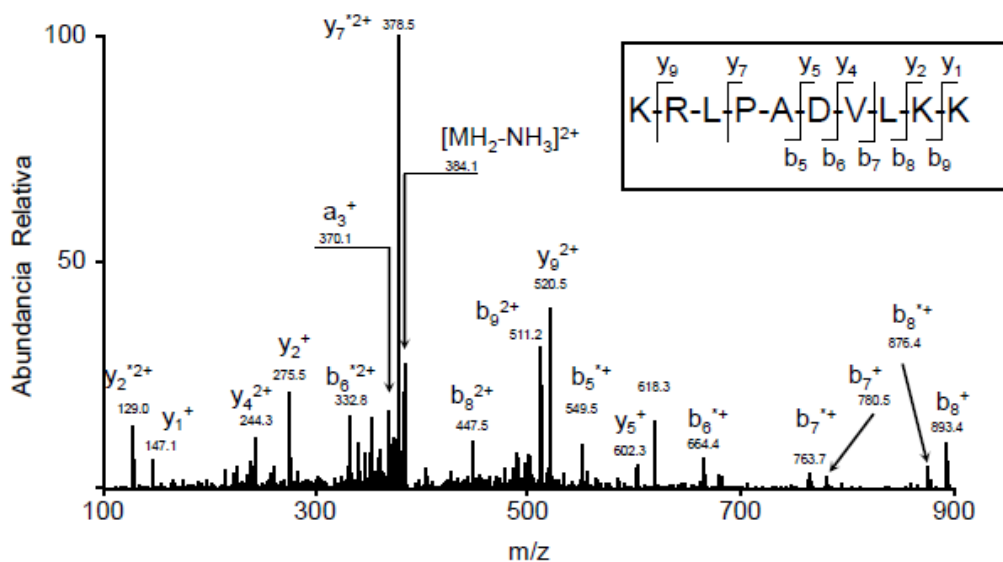


Péptido sintético



**Figura 25. Identificación por Espectrometría de masas del ligando P 2089-2097 en un extracto de células infectadas.** Espectro de fragmentación MS/MS obtenido en la trampa iónica de los iones con una relación  $m/z$  de 525,8 procedente de un extracto de células B27-C1R infectadas con VRSH (panel superior) y el correspondiente péptido sintético (panel inferior). Los ejes representan los mismos datos que en la Figura

Especie molecular con  $m/z$  389,9



Péptido sintético

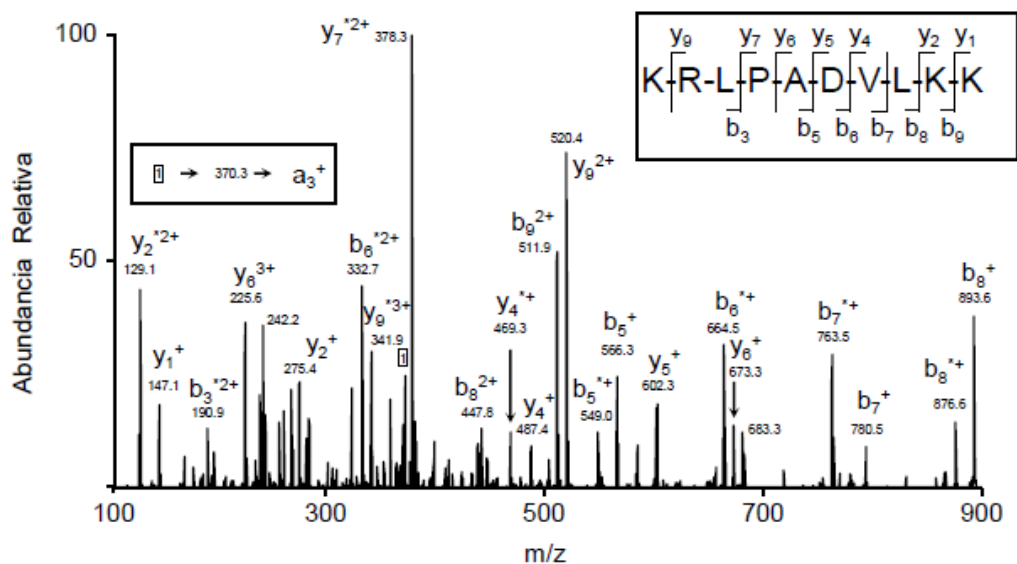
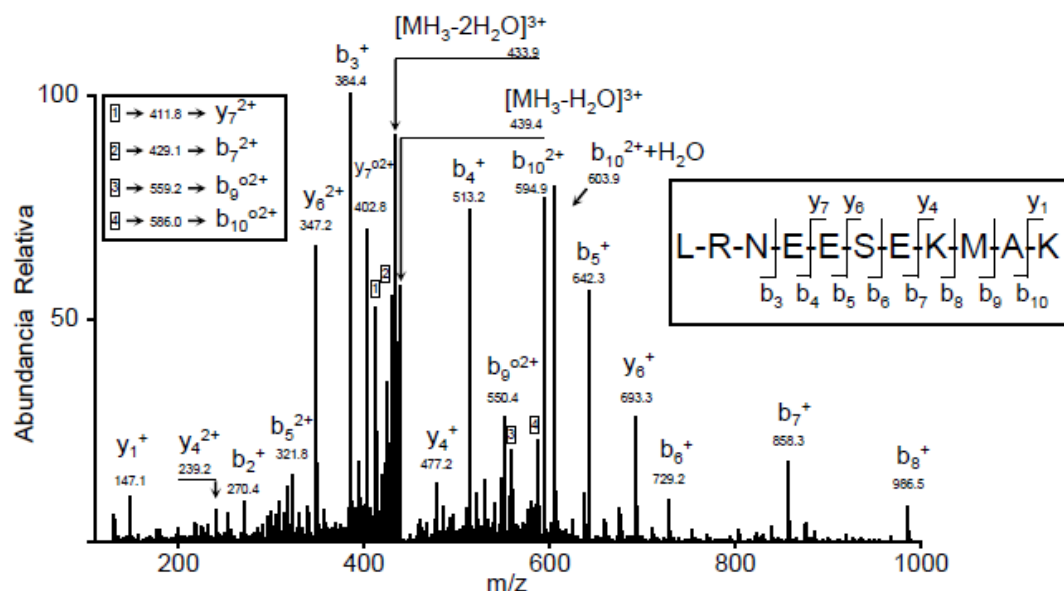


Figura 26. Identificación por Espectrometría de masas del ligando M 2-22k 150-159 en un extracto de células infectadas.

Espectro de fragmentación MS/MS obtenido en la trampa iónica de los iones con una relación  $m/z$  de 389,9 procedente de un extracto de células B27-C1R infectadas con VRSH (panel superior) y el correspondiente péptido sintético (panel inferior). Los ejes representan los mismos datos que en la Figura

Especie molecular con  $m/z$  445,6



Péptido sintético

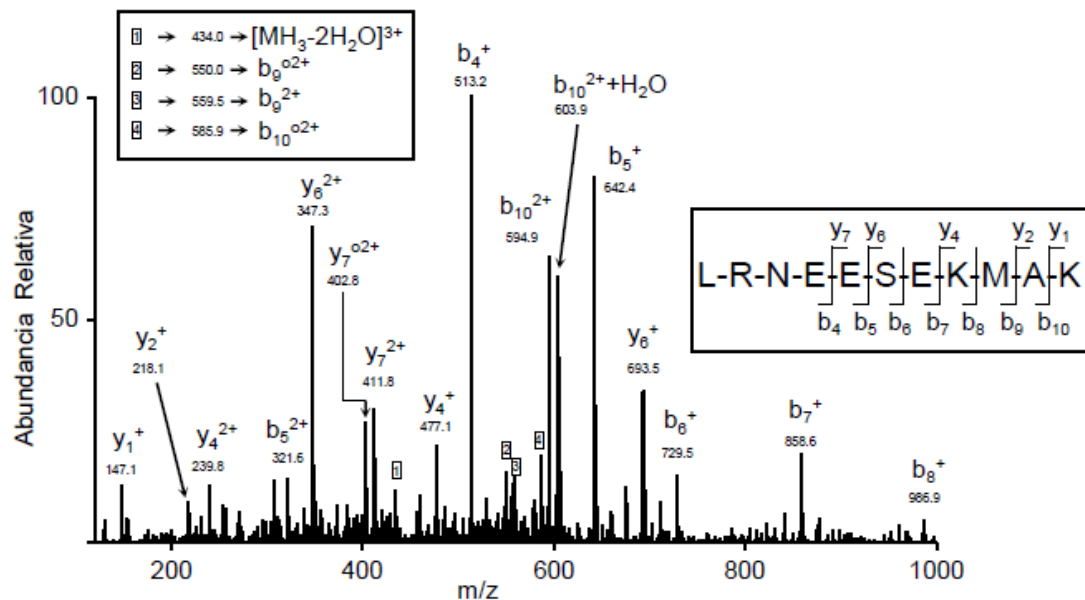
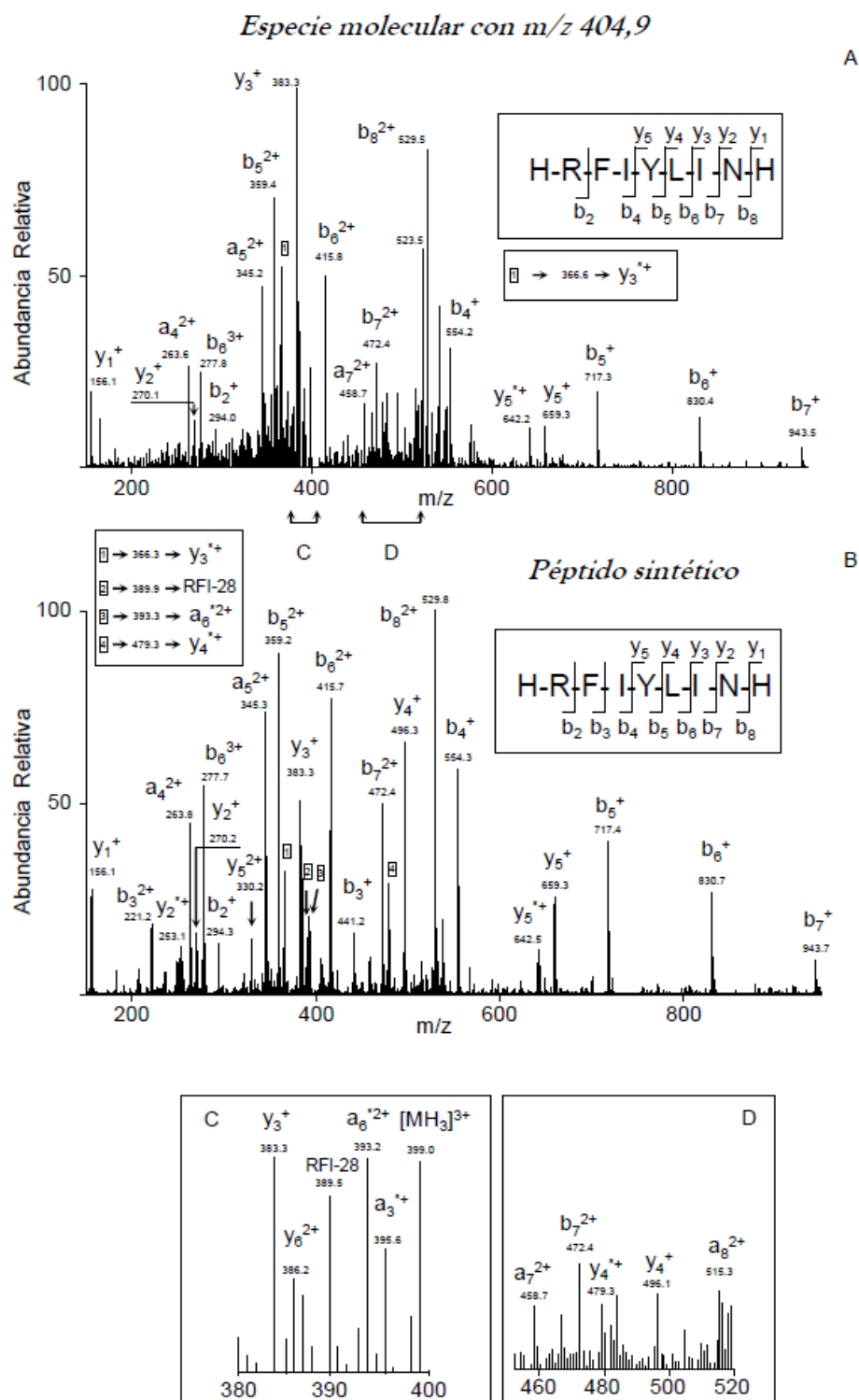


Figura 27. Identificación por Espectrometría de masas del ligando P 198-208 en un extracto de células infectadas.

Espectro de fragmentación MS/MS obtenido en la trampa iónica de los iones con una relación  $m/z$  de 445,6 procedente de un extracto de células B27-C1R infectadas con VRSH (panel superior) y el correspondiente péptido sintético (panel inferior). Los ejes representan los mismos datos que en la Figura



**Figura 28. Identificación por Espectrometría de masas del ligando NS2 37-45 en un extracto de células infectadas.**

Espectro de fragmentación MS/MS obtenido en la trampa iónica de los iones con una relación  $m/z$  de 404,9 procedente de un extracto de células B27-C1R infectadas con VRSH (panel A) y el correspondiente péptido sintético (panel B). Las regiones con una relación  $m/z$  de 380-400 y 455-520 del panel A están ampliadas en los paneles C y D, respectivamente. Los ejes representan los mismos datos que en la Figura

**2 – Los ligandos detectados en células infectadas se unen eficientemente HLA-B\*2705 –**

HLA-B\*2705 une péptidos con Arg en posición 2 (P2) y residuos básicos ó alifáticos en el extremo C-terminal (Base de datos SYFPEITHI : <http://www.syfpeithi.de> (119) y (120)). Dicho motivo de anclaje clásico se encontraba presente en todos los ligandos virales detectados en este estudio (Tabla III).

**Tabla III**  
**Resumen de ligandos de HRSV detectados en el análisis por MS/MS**

Masa Nominal <sup>a</sup>	Masa Experimental <sup>a</sup>	$\Delta$ Masa <sup>b</sup>	m/z	Secuencia <sup>c</sup>	Proteína	Posición
614,299	614,297	0,002	+2	HRQDINGKEM	Nucleoproteína	100-109
409,868	409,868	0,000	+3	HRQDINGKEM	Nucleoproteína	100-109
672,862	672,858	0,004	+2	RRANNVLKNEM	Nucleoproteína	184-194
444,278	444,277	0,001	+3	KRYKGLLPKDI	Nucleoproteína	195-205
488,766	488,764	0,002	+2	SRSALLAQM	Matriz	76-84
536,809	536,807	0,002	+2	VRNKDLNTL	Matriz	169-177
525,770	525,769	0,001	+2	GRNEVFSNK	Polimerasa	2089-2097
389,924	389,922	0,002	+3	KRLPADVLKK	Matriz 2-22k	150-159
445,563	445,562	0,001	+3	LRNEESEKMAK	Fosfoproteína	198-208
404,893	404,891	0,002	+3	HRFIYLINH	Proteína no estructural 2	37-45

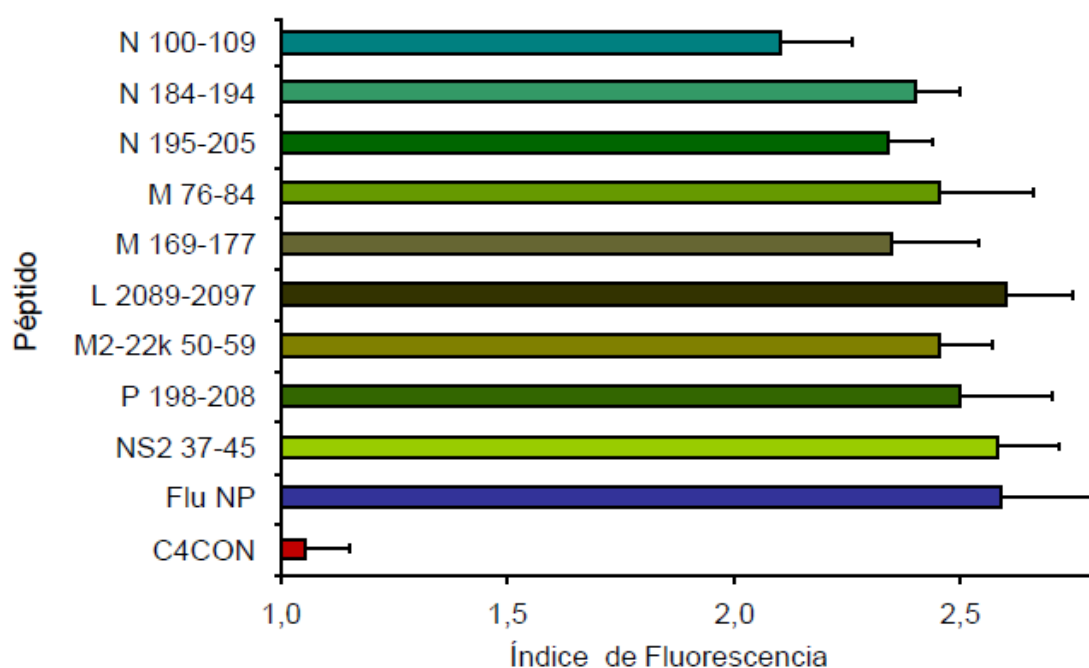
<sup>a</sup> Masa del ión monoisotópico en amv.

<sup>b</sup> Diferencia entre los iones monoisotópicos nominal y el detectado experimentalmente.

<sup>c</sup> Los motivos de anclaje de HLA-B27 se encuentran subrayados.



Aún así, para confirmar que HLA-B\*2705 era la molécula presentadora de estos ligandos, se realizaron ensayos de estabilidad del complejo MHC/péptido utilizando células RMA-S deficientes en TAP transfectadas con la molécula de HLA-B\*2705. En estos ensayos, los nueve péptidos sintéticos inducían un número similar de complejos HLA-péptido en superficie que un epítipo previamente descrito como ligando de HLA-B\*2705 proveniente del virus de la gripe (Figura 29).



**Figura 29. Ensayo de estabilización de HLA con los péptidos sintéticos de VRSH.**

Medida por citometría de flujo de la estabilidad en la superficie celular de los complejos HLA-B\*2705/péptido en las células RMA-S transfectadas. Los péptidos que se indican fueron utilizados a una concentración de 200  $\mu$ M. Los péptidos C4CON y FLU-NP se utilizaron como controles positivos y negativo, respectivamente. Los resultados calculados como IF  $\pm$  SD corresponden a la media de 3 a 4 experimentos independientes.

Además, se determinó para todos los ligandos de VRSH la afinidad relativa por la molécula de MHC de clase I. Estos péptidos se unieron a HLA-B\*2705 con valores de  $C_{50}$  dentro del rango comúnmente aceptado para ligandos naturales (Tabla IV). Así, estos datos indicaban que todos los ligandos detectados en células infectadas por VRSH se presentaban endógenamente asociados a la molécula de HLA-B\*2705. De los nueve péptidos identificados mediante el análisis proteómico, cuatro de ellos (los péptidos de la Matriz 76-84 y 169-177, el de la Polimerasa y de la proteína no estructural 2) eran nonámeros. Además dos péptidos (los ligandos de la Matriz 2-22k y el de la Nucleoproteína 100-109) eran decámeros y los otros tres eran undecámeros (el péptido de la Fosfoproteína, los de la Nucleoproteína 184-194 y 195-205). No se encontró correlación entre la longitud de los péptidos y su afinidad por la molécula de HLA-B\*2705 (Tabla IV).

De los 239 ligandos celulares previamente descritos como unidos a B\*2705 (Base de datos SYFPEITHI), el 4% de ellos eran octámeros, el 65% nonámeros ó decámeros y un 11% eran undecámeros o péptidos más largos. Entonces, esta molécula de HLA puede acomodar fácilmente péptidos protuberantes en su zona central. Los resultados mostrados en la tabla III indicaban también que ligandos virales protuberantes se pueden presentar unidos a la molécula de B\*2705.

*Tabla IV*  
*Resumen de la estabilidad de HLA-B27 con ligandos de VRSH*

Peptido <sup>a</sup>	Secuencia	C <sub>50</sub> (μM) ± SD <sup>b</sup>
N 100-109	HRQDINGKEM	26 ± 5
N 184-194	RRANNVLKNEM	10 ± 1
N 195-205	KRYKGLLPKDI	5 ± 2
M 76-84	SRSALLAQM	9 ± 2
M 169-177	VRNKDLNTL	12 ± 5
L 2089-2097	GRNEVFSNK	18 ± 3
M2-22k 150-159	KRLPADVLKK	9 ± 2
P 198-208	LRNEESEKMAK	14 ± 3
NS2 37-45	HRFIYLINH	11 ± 4
Flu NP	SRYWAIRTR	8 ± 2

<sup>a</sup> Todos los péptidos proceden de la cepa Long de HRSV, excepto NP-Flu 383-391 (101), el cual se ha utilizado como control positivo para los ensayos de estabilidad de HLA-B27.

<sup>b</sup> Los datos corresponden a las medias de tres a cinco experimentos independientes y se expresan como C<sub>50</sub> ± SD.

## *DISCUSIÓN*

***A. La molécula de clase I, H-2L<sup>d</sup> protege in vitro a un epítipo N-extendido del recorte por ERAAP.***

Para estudiar el mecanismo de acción de ERAAP se llevó a cabo el análisis de la actividad de la aminopeptidasa de ratón con el ligando natural más largo N-extendido de MHC I reconocido por CTLs. El sustrato soluble peptídico se recortó eficientemente al nonámero, el cual presenta los motivos de anclaje canónicos de unión a L<sup>d</sup> y que es el mínimo ligando natural que se une a la molécula de clase I H-2L<sup>d</sup>. Por el contrario, los seis residuos N-terminales extendidos fuera de la cavidad de unión del MHC-I no eran accesibles a la actividad de ERAAP cuando el complejo péptido-L<sup>d</sup> está plegado. Los resultados de esta memoria muestran además que el péptido G9I es el producto final del recorte de ERAAP a partir del sustrato K15I, ello coincide con un estudio previo (125) que indicaba que esta enzima recorta residuos N-terminales de precursores antigénicos a menos que se encuentren flanqueados por prolina produciendo una acumulación de péptidos con secuencia X-P-X<sub>n</sub>. Entonces, ERAAP no es capaz de recortar tampoco el enlace Gly-Pro del péptido G9I.

Estudios previos (126), (127) y (128) demostraban que la actividad enzimática de ERAAP en microsomas o células vivas recortaba los péptidos precursores en cortos periodos de tiempo (minutos). Por el contrario en ensayos *in vitro* ERAAP era más ineficiente ya que se necesitaba mayor tiempo de incubación (del orden de horas) para recortar precursores peptídicos (40). Esto también es válido para las enzimas ERAP humanas al recortar el mismo precursor K15I (43). El presente estudio demuestra que ERAAP recorta al péptido K15I en segundos, degradándolo totalmente en pocos minutos. Por lo tanto, algunos péptidos pueden ser recortados *in vitro* por ERAAP con eficiencia fisiológica.

Considerando que el recorte por parte de ERAAP es muy eficiente sobre el péptido K15I soluble, generando los péptidos más cortos R10I y sobretodo G9I, pero que no puede recortar los 6 residuos extendidos en el N-terminal del péptido K15I cuando el complejo péptido-MHC I está totalmente plegado, existen dos posibles explicaciones para los resultados presentados en la actual memoria y los estudios anteriores (50) y (129). Primero, el sustrato K15I puede ser eficientemente transportado por TAP murino al RE como sugieren estudios previos (50). En el lumen del RE la mayor parte del sustrato se pliega rápida y eficientemente con las moléculas de H-2L<sup>d</sup> protegiéndose de la actividad de ERAAP. El resto de moléculas del péptido K15I podrían estar accesibles a ERAAP y ser recortadas hasta el péptido R10I. Una fracción de este péptido podría protegerse por L<sup>d</sup> y el resto ser nuevamente recortado al producto final G9I que también podría estabilizar eficientemente moléculas de MHC. Alternativamente, los tres ligandos naturales presentados por MHC I podrían ser generados de forma independiente en el citosol y ser transportados al lumen del RE. Allí, para poder ser protegidos del recorte por parte de ERAAP, ambos ligandos N-extendidos (K15I y R10I) deberían unirse rápidamente a moléculas de MHC-I ya que su afinidad es similar a la del epítipo mínimo (50) y (129).

Esta segunda explicación se apoya en la identificación de la mezcla natural de péptidos presentados por Ld procedentes del procesamiento endógeno en células infectadas de sólo los ligandos naturales G9I, R10I y K15I, en contraste con las afinidades de unión similares a MHC del conjunto total de los péptidos sintéticos anteriormente estudiados (G9I, R10I, Q11I, I12I, R13I y K15I), (50).

Además, los datos de esta memoria muestran que la molécula H-2L<sup>d</sup> protege a dos péptidos N-extendidos: el ligando natural K15I y el intermedio R13I de VIH del recorte por ERAAP. Esto indica que la enzima no puede recortar al ligando cuando el complejo MHC-péptido está totalmente plegado. Estos datos se ajustan al modelo de la regla molecular y entran en contradicción con el modelo del molde. Sin embargo, este modelo aún se podría aplicar a este epítipo particular si ERAAP recortara el sustrato unido a MHC cuando estuviera unido a L<sup>d</sup> durante la formación del complejo de carga del péptido. Hasta la actualidad no se ha descrito ningún tipo de interacción física entre ERAAP y cualquiera de las proteínas implicadas en la formación de dicho complejo. Además, la existencia del ligando natural R10I (que no se recorta hasta el ligando mínimo, G9I) detectado previamente en células infectadas no favorecía esta posibilidad (50).

***B. Interacción no canónica de un ligando viral con HLA-Cw4 en células infectadas con el virus respiratorio sincitial humano.***

En el único estudio previo sobre identificación de ligandos naturales de VRSH unidos a moléculas de HLA, se identificó un ligando de VRSH para cada una de las moléculas de HLA-A2 ó -B7 estudiadas (84). Dicho estudio se realizó cultivando células infectadas con los aminoácidos marcados radiactivamente que más frecuentemente se utilizan como residuos de anclaje por las moléculas de HLA presentadoras a estudiar. En los datos presentados en la actual memoria utilizando un número similar de células y un enfoque proteómico más clásico se identifica también un ligando de VRSH. El marcaje isotópico de residuos de anclaje favorece la detección de péptidos con los motivos de anclaje canónicos. Así, utilizando esta metodología dirigida se introducen sesgos artificiales en este tipo de estudios complejos y entonces ligandos inusuales como el M188-195 podrían no ser detectados.

Por otra parte, la detección en nuestro estudio de un péptido natural viral sin el motivo de anclaje de HLA-Cw4 revela las limitaciones existentes en los actuales métodos de predicción de secuencias de epítomos para la identificación de ligandos unidos a MHC-I y de epítomos de células T. El uso de estos algoritmos analíticos puede no ser lo suficientemente preciso y sería muy recomendable ser prudentes con respecto a su uso. Actualmente, alrededor de unos cincuenta ligandos de HLA-Cw4 procesados endógenamente con Tyr y Phe en posición 2 como motivo de anclaje han sido identificados y provenientes de proteínas celulares (121) y (122). Por el contrario, existen muy pocos estudios donde se identifique ligandos virales unidos a HLA-Cw4. El péptido NVFPIFLQM de la proteína L1 del virus del papiloma humano se identificó de un eluido de HLA-Cw4 purificado (130). Este péptido viral con una Asn en el extremo N-terminal y seguida de un residuo relativamente pequeño en la posición P2 se asemeja mucho al nonámero NAITNAKII procedente de la proteína de la matriz de VRSH y presentado por D<sup>b</sup>, el cual también se une a Cw4 como péptido sintético. Probablemente, los primeros 3 residuos de ambos péptidos virales se unen a la molécula de HLA-Cw4 con residuos hidrofóbicos (Phe ó Ile) ocupando la posición 3 de la subcavidad B de la molécula de HLA como se sugiere en el modelo de la Figura 17. Además, se han identificado otros dos epítomos de VIH presentados ambos por HLA-Cw4, uno en la proteína gp120 (FNCGGEFF, residuos 377-383) (131) y el otro en la proteasa (QYDQIPIEI, residuos 58-66) (132). Al igual que el ligando viral AITNAKII descrito en el presente estudio, dos de estos tres ligandos no mostraban los motivos de anclaje de unión canónicos a HLA-Cw4. Por lo tanto, el uso de algoritmos predictivos de epítomos basados en parámetros como los motivos de anclaje a HLA para la identificación de ligandos virales de moléculas de HLA de clase I y de epítomos de células T pueden no ser pertinentes para HLA-Cw4.

El presente estudio también revela que el octámero presentado por HLA-Cw4 es casi idéntico al nonámero presentado por la molécula de clase I murina D<sup>b</sup> en células infectadas. Estudios previos han identificado diversos epítomos presentados por alelos de MHC-I de diferentes especies.

Estos estudios incluyen 5, 3 y 1 ligandos compartidos entre moléculas de MHC-I humanas y de macaco rhesus, de macaco rhesus y de ratón y entre dos clases diferentes de MHC-I de chimpancé, respectivamente (133), (134) y (135). Las parejas de moléculas de MHC que presentaban reacción cruzada se diferenciaban entre 6 y 42 residuos y tenían marcadas diferencias tanto en la secuencia como en la estructura del sitio de unión de los péptidos. Sin embargo, en todos los casos publicados los

motivos de anclaje de los péptidos presentados por MHC-I que mostraban reacción cruzada fueron muy similares. Nuestro estudio presenta un carácter marcadamente diferente comparado con estos estudios previos sobre la reacción cruzada entre especies, porque las moléculas HLA-Cw4 humana y H-2D<sup>b</sup> murina tienen hasta 52 residuos diferentes en los dominios  $\alpha 1\alpha 2$  de unión del péptido y presentan motivos de anclaje de péptidos muy diferentes (121), (122) y (9). Por lo tanto no son necesarios similares motivos de anclaje entre moléculas de MHC-I de diferentes especies con reactividad cruzada para unir un ligando muy similar. Finalmente, este hecho muestra la complejidad y plasticidad de las interacciones existentes en los complejos MHC-péptido.

En la mayoría de los casos se supone que los ligandos naturales tienen la mínima longitud, los motivos de anclaje canónicos y la antigenicidad cuando son estudiados como péptidos sintéticos. Sin embargo, dos estudios anteriores sobre el procesamiento endógeno de la glicoproteína de la envuelta de VIH pueden ayudar a comprender los límites de esta hipótesis. En el primer estudio se identificaron péptidos de diferente longitud pero que compartían el mismo núcleo antigénico. Estos ligandos virales se encontraban unidos a la molécula D<sup>d</sup> en células infectadas (129). Estas especies eran un decapeptido con los motivos de anclaje canónicos para la molécula presentadora y su respectivo nonúmero que carecía del correcto residuo N-terminal para unirse a la molécula de D<sup>d</sup>. Cabe destacar que ambas especies eran igual de antigénicas al ser estudiadas frente a CTLs específicos. Del mismo modo, en el segundo estudio se identificó un conjunto de tres ligandos naturales de la misma proteína viral presentados por H-2L<sup>d</sup>. Estos ligandos presentaban una longitud de 15, 10 y 9 aminoácidos compartiendo un núcleo C-terminal idéntico de 9 aa (50). El nonúmero contenía los motivos de anclaje canónicos de unión a L<sup>d</sup> mientras que las otras dos especies presentaban uno y seis residuos extendidos en el extremo N-terminal. Aunque el péptido con seis residuos extendidos en el extremo N-terminal era menos antigénico que el péptido de nueve residuos, sin embargo era mucho más abundante en las células infectadas. En línea con estos estudios, los resultados presentados en el actual trabajo muestran que el ligando octamérico natural unido a HLA-Cw4 en las células infectadas no es el péptido óptimo para esta molécula de MHC-I, tal y como indica su menor afinidad *in vitro* por la molécula de HLA-Cw4 en comparación con el nonúmero que presenta un residuo N-terminal adicional. Si en este caso se hubieran utilizado los habituales ensayos con péptidos sintéticos truncados solapantes, como es frecuente en los estudios de desarrollo de vacunas, el nonúmero pero no el octámero natural hubiera sido definido como el ligando de unión a esta molécula de HLA. Por tanto la extrapolación de la antigenicidad o mejor unión a MHC no son suficientes para identificar ligandos naturales presentados por MHC-I.

Estas limitaciones se pueden aplicar también a la previa definición del epítipo de 9 residuos M187-195 presentado por D<sup>b</sup> y reconocido por CTLs (123). En este estudio se utilizó la mencionada estrategia de los péptidos truncados solapantes. Tanto el octámero M187-195 como el nonúmero M188-195 inducían alta producción de IFN- $\gamma$  por las células T CD8<sup>+</sup> específicas siendo ligeramente superior con el nonúmero coincidiendo con los datos de unión a D<sup>b</sup> mostrados en la Figura 16. Como el nonúmero se ajusta a la longitud canónica de un epítipo reconocido por MHC-I y fue predicho mediante algoritmos de la unión a MHC, los autores de este estudio lo definieron como el epítipo natural (123). El octámero M188-195 carente del residuo N-terminal podría unirse a moléculas H-2D<sup>b</sup> al igual que otros péptidos que carecen de este residuo se unen endógenamente a otras moléculas de

MHC-I (136) y (129). Ello indica que las interacciones MHC-péptido en la subcavidad de la posición 1 no son siempre necesarias para la presentación endógena de péptidos. Por lo tanto, solo la detección de uno ó ambos péptidos en el repertorio de ligandos presentados por D<sup>b</sup> en células murinas infectadas podrá determinar la naturaleza exacta del epítipo de la proteína de la matriz de VRSH.

En conjunto, los resultados del presente estudio destacan la importancia del análisis de péptidos naturales procedentes del procesamiento endógeno de proteínas virales. Siendo fundamental este análisis para comprender de una manera más detallada la inmunidad mediada por MHC de clase I y el diseño racional de vacunas.



### **C. Ligandos virales asociados a HLA-B27.**

#### **C.1 – Los ligandos presentados por HLA-B\*2705 en células infectadas por VRSH proceden de proteínas internas virus –**

El genoma de VRSH codifica para once proteínas (54). En general en este proteoma las proteínas más grandes, con excepción de la proteína G, contienen más residuos de Arg que es el motivo de anclaje en P2 de los péptidos que se unen a B27 (Tabla V). Por tanto, estas proteínas grandes son candidatas a ser la fuente de generación de epítomos restringidos por HLA-B27. Los nueve ligandos identificados unidos a HLA-B\*2705 derivaban de proteínas virales con un número significativo de Arg en sus respectivas secuencias proteicas, con una única excepción. La proteína F es la segunda proteína más larga en el proteoma de VRSH y la segunda también más enriquecida en Arg, puesto que contiene 18 residuos (Tabla V).

**Tabla V**  
**Distribución del contenido de Arg en los ligandos de HLA-B27 en el proteoma de HRSV**

Proteína de la cepa Long <sup>a</sup>	Número de Arg <sup>b</sup>	% de Arg <sup>c</sup>	Número de residuos <sup>d</sup>	% proteoma <sup>e</sup>	Ligandos <sup>f</sup>
L	81	51,6	2165	49,2	1
F	18	11,5	573	13,0	0
N	16	10,2	391	8,9	3
P	11	7,0	219	5,0	1
M2-22k	11	7,0	195	4,4	1
M	6	3,8	256	5,8	2
NS2	6	3,8	124	2,8	1
M2-2	3	1,9	90	2,0	0
G	2	1,3	186	4,2	0
SH	2	1,3	65	1,5	0
NS1	1	0,6	138	3,1	0

<sup>a</sup> Las abreviaturas usadas son las siguientes: L (Polimerasa), F (Proteína de Fusión), N (Nucleoproteína), P (Fosfoproteína), M2-22k (Proteína de la Matriz 22k), M (Proteína de la Matriz), NS2 (Proteína no-estructural 2), M2-2 (Proteína 2 de la Matriz), G (Proteína de unión al receptor), SH (Proteína pequeña hidrofóbica) y NS1 (Proteína no-estructural 1).

<sup>b</sup> Número de Arg en el proteoma viral.

<sup>c</sup> Porcentaje de Arg en el proteoma viral.

<sup>d</sup> Número total de residuos.

<sup>e</sup> Porcentaje del número de residuos de cada proteína /número total de residuos.

<sup>f</sup> Número de ligandos de HLA-B27 en VRSH.

El uso de varios programas bioinformáticos disponibles en internet mostró que la proteína F poseía péptidos con unos valores similares de posible unión a HLA-B27 a otras proteínas con abundante número de Arg. Además de la proteína de fusión F de la envuelta, el VRSH contiene otras dos glicoproteínas de transmembrana en su superficie celular, la proteína G y la pequeña proteína hidrofóbica (SH) (54). Ambas proteínas G y SH contienen sólo dos Arg en su secuencia de aminoácidos, residuos que son necesarios como anclaje a la molécula HLA-B27. Así, el que no aparecieran este tipo de ligandos de HLA-B27 en las proteínas de la envuelta era esperable pero no de la proteína F. Por tanto, la ausencia de ligandos de la proteína F y de las proteínas G y SH, indicaba que HLA-B\*2705 exclusivamente mostraba ligandos procedentes de proteínas internas de VRSH. La ausencia de ligandos de las proteínas de la envuelta también ha sido descrito para epítomos del alelo HLA-B\*2702 en el virus de la gripe (137). Por tanto, para algunas parejas de virus y HLAs sólo se encuentran ligandos de proteínas internas asociados a las moléculas de clase I.

### ***C.2 – La mayoría de ligandos virales de HLA-B\*2705 no están conservados entre los diferentes subgrupos antigénicos de VRSH –***

Existe sólo un serotipo de VRSH pero con dos subgrupos antigénicos: A y B (54). La mayoría de las proteínas se encuentran altamente conservadas entre estos subgrupos (88-96% de identidad). Las mayores diferencias se encuentran en las proteínas M2-2, G y SH (entre un 61-71% de los aminoácidos son idénticos). El porcentaje de identidad de nucleótidos y aminoácidos dentro de cada subgrupo de este virus es mucho mayor para todas las proteínas (97-100% de los aminoácidos son idénticos). Además, las mutaciones de escape frente al sistema inmune del hospedador no parecen acumularse con el tiempo en este virus (54). Por lo tanto, sería razonable deducir identidad de los ligandos virales presentados por HLA-B\*2705 entre las cepas de los distintos subgrupos. Se compararon las secuencias de aminoácidos de los ligandos identificados en la cepa Long con otras dos y tres cepas representativas de los subgrupos A y B respectivamente. La tabla VI muestra que dos tercios de los ligandos detectados en la cepa Long están mutados en todas las cepas secuenciadas del subgrupo B. Los ligandos N 195-205 y M 76-84 tenían mutaciones en los residuos de interacción con el TCR, mientras que los ligandos N 100-109 y N 184-194 tenían alterados los residuos de los extremos carboxilo y aminoterminales, respectivamente. Las secuencias del subgrupo B presentaban alteraciones tanto en la posición P2 como un cambio adicional en la secuencia de los ligandos NS2 37-45 y M 169-177. Sólo los péptidos P 198-208, M2-22k 150-159 y L 2089-2097 se encontraban conservados en todas las cepas estudiadas. Además, dos ligandos no estaban conservados entre todas las cepas del subgrupo A: una Arg estaba cambiada por una Lys en el ligando NS2 37-45 de la cepa A2 y también se detectó una sustitución de Val → Leu en las cepas S2 y A2. Además, la sustitución en la posición 80 es el único cambio en la secuencia de la proteína M entre las cepas Long y A2. De manera similar, sólo los residuos 8, 26 y 38 se encontraban alterados en la proteína NS2 entre las diferentes cepas de este subgrupo.

**Tabla VI**  
**Conservación de los ligandos virales de HLA-B27 en las diversas cepas de VRSH**

Cepa <sup>a</sup>	N 195-205	M 76-84	N 100-109	N 184-194	NS2 37-45	M 169-177	P 198-208	M2-22k 150-159	L 2089-2097
Long	KRYKGLLPKDI	SRSALLAQM	HRQDINGKEM	RRANNVLKNEM	HRFIYLINH	VRNKDLNTL	LRNEESEKMAK	KRLPADVLKK	GRNEVFSNK
S2	-----	---V---	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----
A2	-----	---V---	-----	-----	-K-----	-----	-----	-----	-----
9320	-----I----	---V---	Y-----	-----I	-K-----N	-K-----S-	-----	-----	-----
18537	-----I----	---V---	Y-----	-----I	-K-----N	-K-----S-	-----	-----	-----
B1	-----I----	---V---	Y-----	-----I	-K-----N	-K-----S-	-----	-----	-----

<sup>a</sup> Las cepas Long, S2 y A2 son representativas del subtipo A de VRSH, mientras que las cepas 9320, 18537 y B1 son del subtipo B de VRSH.

### ***C.3 – Una fracción significativa del proteoma viral fue presentada en asociación con la molécula de clase I B\*2705 –***

El proteoma de VRSH de la cepa Long contiene 4402 residuos de los cuales 157 son Arg. Entonces, los nueve ligandos detectados representan el 2% del proteoma y el 6% de los posibles ligandos asociados a B\*2705 (Tabla VII).

En otros virus ARN, con tamaño de proteomas similares y parecidos en contenido en Arg, se han identificado entre 6-13 epítomos asociados a B\*2705 (datos resumidos en “Immune Epitope Database”) (138). Como se muestra en la tabla VII el porcentaje de “immune coverage” es similar en estos virus RNA: alrededor de un 2-4% del total del proteoma y entre un 2-7% del número máximo de potenciales ligandos de HLA-B\*2705. Si estos datos fuesen extrapolables para todas las moléculas de HLA de clase I, la respuesta inmune celular podría “cubrir” entre un 14-25% del proteoma de estos patógenos virales en individuos infectados heterocigotos para HLA de clase I.

*Tabla VII*

*Tamaño del proteoma, contenido de Arg y epítomos asociados para HLA-B27 en varios virus RNA*

Virus <sup>a</sup>	Proteoma		Arg		Epítomos <sup>f</sup>
	Residuos <sup>b</sup>	% <sup>c</sup>	Número <sup>d</sup>	% <sup>e</sup>	
HRSV	4402	2%	157	6%	9
Gripe	4112	2%	284	2%	6
VIH	3151	4%	184	7%	13

<sup>a</sup>Las secuencias usadas fueron: cepa Long de VRSH, cepa A/Puerto Rico/8/34 de Gripe y secuencia consenso del Clade B de VIH (Los Alamos National Laboratory) NIH.

<sup>b</sup>Número total de residuos.

<sup>c</sup>Porcentaje del proteoma incluido en los epítomos/ligandos detectados.

<sup>d</sup>Número de Arg en cada proteoma viral.

<sup>e</sup>Relación en porcentaje entre el número de epítomos o ligandos y el número total de Arg.

<sup>f</sup>Número de ligandos en VRSH.

## ***D – Discusión general –***

La inmunoproteómica ó los métodos basados en espectrometría de masas aplicadas al estudio de la respuesta inmune es un concepto relativamente nuevo en el campo de la proteómica puesto que esta expresión fue introducida por primera vez por Jungblut en el año 2001 (139). Sin embargo, la inmunoproteómica se ha aplicado anteriormente al subconjunto de proteínas implicadas en la respuesta inmune. Este conjunto de antígenos identificados ha sido altamente dependiente de la tecnología aplicada. Los organismos que presentan un sistema inmunológico sofisticado tienen la capacidad para distinguir entre proteínas "propias" y "no propias". En la mayoría de los casos, las proteínas no propias proceden de patógenos como hongos, parásitos, bacterias y virus, aunque también las proteínas del huésped que sólo se producen durante un cierto momento de las enfermedades (por ejemplo el cáncer) pueden ser reconocidas como no propias. La cuestión clave en inmunoproteómica es visualizar lo que el sistema inmune ve en esta clase de enfermedades. La aproximación clásica en proteómica ha sido el gel bidimensional 2-D PAGE que fue descrito por primera vez en 1975 (140). Esta técnica puede ser utilizada para separar mezclas complejas de hasta cientos de proteínas en un solo experimento. De hecho, esta resolución fue el punto de partida para comenzar a estudiar el proteoma de los sistemas biológicos. Mediante la combinación del gel 2-D PAGE con inmunotransferencia y MS se pueden aislar e identificar proteínas antigénicas. Además, la bioinformática se ha convertido en algo esencial para la investigación en proteómica ya que proporciona la interpretación de los datos experimentales para seguir la investigación experimental.

Durante la infección viral, las moléculas de MHC van a presentar ligandos procedentes de proteínas virales (141). Entre las aproximaciones experimentales para el estudio de la presentación antigénica, las relacionadas con la identificación de repertorios peptídicos asociados a las moléculas de MHC, tienen una especial importancia; ya que estos péptidos son clave en el reconocimiento de antígeno por los linfocitos T y la respuesta inmune. La espectrometría de masas se ha utilizado satisfactoriamente para identificar epítomos virales restringidos por moléculas de MHC de clase I analizando repertorios de péptidos procedentes de células infectadas por virus y procedentes de células control sin infectar. Varias técnicas se han desarrollado para explorar cambios en los péptidos asociados a MHC en la superficie de células presentadoras de antígeno. Estos análisis se han basado generalmente en el aislamiento de complejos MHC-péptido, elución ácida de péptidos unidos a moléculas de MHC seguido del análisis por espectrometría de masas de los ligandos identificados tal y como se presentado en esta memoria. Las desventajas de estos ensayos basados en MS son tres: a) los instrumentos relativamente caros, b) los protocolos para el análisis e interpretación de los datos son también complicados y c) la complejidad de las mezclas de péptidos a analizar es muy alta. Sin embargo la flexibilidad de múltiples modos de MS/MS desarrollados en los últimos años han permitido el desarrollo de la inmunoproteómica aplicada a ligandos de MHC.

Además de los estudios ya presentados en apartados previos de la discusión, se ha realizado un estudio inmunoproteómico de ligandos virales presentados por moléculas de HLA de clase I en células infectadas por el virus del Nilo occidental en donde se identificaron seis epítomos derivados de cinco

proteínas de este virus presentados por moléculas HLA-A\*0201 (142). Cuando se compararon las secuencias de estos epítomos con los distintos aislados virales circulantes, se demostró que HLA-A2 presenta epítomos derivados de regiones conservadas de este virus, a diferencia del estudio presentado en esta memoria en donde se han identificado nueve ligados virales presentados por HLA-B27 y por HLA-Cw4 mayoritariamente no conservados entre distintos aislados del virus respiratorio sincitial humano.

Los enfoques basados en la espectrometría de masas se han utilizado para identificar epítomos naturalmente procesados y aislados de la superficie de células presentadoras de antígeno, siendo candidatos para el desarrollo de nuevas vacunas, no obstante existen numerosas barreras que han impedido hasta la fecha su éxito en la clínica. Entre estos obstáculos tenemos la inherente falta de inmunogenicidad de los péptidos que se está abordando con el uso de adyuvantes fuertes y estrategias inmunopotenciadoras. Otro obstáculo importante para el desarrollo de vacunas basadas en péptidos se debe a la necesidad de utilizar más de un epítomo en cada preparación como consecuencia de la restricción por el MHC, aunque se podría incluir epítomos derivados de diversos antígenos para cubrir ampliamente una enfermedad y prevenir así la aparición de mutantes resistentes. Por lo tanto, las vacunas basadas en péptidos parecen ser una forma atractiva de tratamiento de enfermedades.

## *CONCLUSIONES*

### **CONCLUSIONES**

1. ERAAP recorta eficientemente al ligando natural N-extendido K15I hasta el péptido mínimo G9I que es el ligando natural mínimo presentado por H-2L<sup>d</sup> y D<sup>d</sup> en células infectadas.
2. La molécula H-2L<sup>d</sup> protege a ligandos N-extendidos del recorte in vitro por parte de ERAAP.
3. El patrón de recorte por parte de ERAAP se ajusta al modelo de la regla molecular y entra en contradicción con el modelo del molde.
4. Por medio de un análisis comparativo inmunoproteómico se identificó un ligando viral inusual con interacciones a HLA-Cw4 no canónicas en células infectadas por VRSH.
5. Tanto el octámero viral M188-195 unido a HLA-Cw4 como el nonámero M187-195 de VRSH previamente descrito como unido a H-2D<sup>d</sup> muestran idénticos patrones de unión en células humanas y murinas, a pesar de que ambos carecen de los motivos canónicos de interacción con HLA-Cw4.
6. Ambos ligandos virales: octámero y nonámero presentan una conformación diferencial respecto a su unión a la molécula de HLA-Cw4.
7. Un total de nueve ligandos específicos fueron procesados endógenamente y presentados por la molécula HLA-B\*2705 en la línea celular infectada por VRSH.
8. Todos los ligandos virales unidos a HLA proceden de proteínas internas de VRSH.
9. La mayoría de los ligandos virales identificados no están conservados entre los diferentes subgrupos antigénicos de VRSH.
10. Una fracción significativa del proteoma viral de HRSV fue presentada en asociación con la molécula de clase I HLA-B27.



## ***REFERENCIAS***

1. Zinkernagel, R. M. and P. C. Doherty. 1974. Restriction of in vitro T cell-mediated cytotoxicity in lymphocytic choriomeningitis within a syngeneic or semiallogeneic system. *Nature* 248: 701-702.
2. Bjorkman, P. J., M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger, and D. C. Wiley. 1987. Structure of the human class I histocompatibility antigen, HLA-A2. *Nature* 329: 506-512.
3. Bjorkman, P. J., M. A. Saper, B. Samraoui, W. S. Bennett, J. L. Strominger, and D. C. Wiley. 1987. The foreign antigen binding site and T cell recognition regions of class I histocompatibility antigens. *Nature* 329: 512-518.
4. Saper, M. A., P. J. Bjorkman, and D. C. Wiley. 1991. Refined structure of the human histocompatibility antigen HLA-A2 at 2.6 Å resolution. *J. Mol. Biol.* 219: 277-319.
5. Loll, B., A. Zawacka, J. Biesiadka, C. Petter, C. Ruckert, W. Saenger, B. Uchanska-Ziegler, and A. Ziegler. 2005. Preliminary X-ray diffraction analysis of crystals from the recombinantly expressed human major histocompatibility antigen HLA-B\*2704 in complex with a viral peptide and with a self-peptide. *Acta Crystallogr. Sect. F. Struct. Biol. Cryst. Commun.* 61: 939-941.
6. Madden, D. R. 1995. The three-dimensional structure of peptide-MHC complexes. *Annu. Rev. Immunol.* 13: 587-622.
7. Bjorkman, P. J. and P. Parham. 1990. Structure, function, and diversity of class I major histocompatibility complex molecules. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 253-288.
8. Bouvier, M. 2003. Accessory proteins and the assembly of human class I MHC molecules: a molecular and structural perspective. *Mol. Immunol.* 39: 697-706.
9. Falk, K., O. Rotzschke, S. Stevanovic, G. Jung, and H. G. Rammensee. 1991. Allele-specific motifs revealed by sequencing of self-peptides eluted from MHC molecules. *Nature* 351: 290-296.
10. Madden, D. R., J. C. Gorga, J. L. Strominger, and D. C. Wiley. 1991. The structure of HLA-B27 reveals nonamer self-peptides bound in an extended conformation. *Nature* 353: 321-325.
11. Guo, H. C., T. S. Jardetzky, T. P. Garrett, W. S. Lane, J. L. Strominger, and D. C. Wiley. 1992. Different length peptides bind to HLA-Aw68 similarly at their ends but bulge out in the middle. *Nature* 360: 364-366.
12. Marrack, P., K. Rubtsova, J. Scott-Browne, and J. W. Kappler. 2008. T cell receptor specificity for major histocompatibility complex proteins. *Curr. Opin. Immunol.* 20: 203-207.
13. Rudolph, M. G. and I. A. Wilson. 2002. The specificity of TCR/pMHC interaction. *Curr. Opin. Immunol.* 14: 52-65.
14. Pamer, E. and P. Cresswell. 1998. Mechanisms of MHC class I-restricted antigen processing. *Annu. Rev. Immunol.* 16: 323-358.

15. Rock, K. L., C. Gramm, L. Rothstein, K. Clark, R. Stein, L. Dick, D. Hwang, and A. L. Goldberg. 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell* 78: 761-771.
16. Lowe, J., D. Stock, B. Jap, P. Zwickl, W. Baumeister, and R. Huber. 1995. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon *T. acidophilum* at 3.4 Å resolution. *Science* 268: 533-539.
17. Zwickl, P., E. Seemuller, B. Kapelari, and W. Baumeister. 2001. The proteasome: a supramolecular assembly designed for controlled proteolysis. *Adv. Protein Chem.* 59: 187-222.
18. Stohwasser, R., S. Ständera, I. Peters, P. M. Kloetzel, and M. Groettrup. 1997. Molecular cloning of the mouse proteasome subunits MC14 and MECL-1 reciprocally regulated tissue expression of interferon-gamma- modulated proteasome subunits. *European Journal of Immunology* 27: 1182-1187.
19. Rock, K. L. and A. L. Goldberg. 1999. Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides. *Annu. Rev. Immunol.* 17: 739-779.
20. Guillaume, B., J. Chapiro, V. Stroobant, D. Colau, B. Van Holle, G. Parvizi, M. P. Bousquet-Dubouch, I. Theate, N. Parmentier, and B. J. Van den Eynde. 2010. Two abundant proteasome subtypes that uniquely process some antigens presented by HLA class I molecules. *Proc. Natl Acad. Sci. U. S. A* 107: 18599-18604.
21. Voigt, A., U. Salzmänn, U. Seifert, M. Dathe, A. Soza, P. M. Kloetzel, and U. Kuckelkorn. 2007. 20S proteasome-dependent generation of an IEpp89 murine cytomegalovirus-derived H-2L(d) epitope from a recombinant protein. *Biochem. Biophys. Res Commun.* 355: 549-554.
22. Knowlton, J. R., S. C. Johnston, F. G. Whitby, C. Realini, Z. G. Zhang, Rechsteiner, M, and C. P. Hill. 1997. Structure of the proteasome activator REG-alpha (PA28-ALPHA). *Nature* 390: 639-643.
23. Reits, E., J. Neijssen, C. Herberts, W. Benckhuijsen, L. Janssen, J. W. Drijfhout, and J. Neefjes. 2004. A major role for TPPII in trimming proteasomal degradation products for MHC class I antigen presentation. *Immunity*. 20: 495-506.
24. Lévy, F., L. Burri, S. Morel, A. L. Peitrequin, N. Lévy, A. Bachi, U. Hellman, B. J. Van den Eynde, and C. Servis. 2002. The final N-terminal trimming of a subaminoterminal proline-containing HLA class I-restricted antigenic peptide in the cytosol is mediated by two peptidases. *J. Immunol.* 169: 4161-4171.
25. Seifert, U., C. Marañón, A. Shmueli, J. F. Desoutter, L. Wesoloski, K. Janek, P. Henklein, S. Diescher, M. Andrieu, H. de la Salle, T. Weinschenk, H. Schild, D. Laderach, A. Galy, G. Haas, P. M. Kloetzel, Y. Reiss, and A. Hosmalin. 2003. An essential role for tripeptidyl peptidase in the generation of an MHC class I epitope. *Nat. Immunol.* 4: 375-379.

26. Yewdell, J. W. and C. V. Nicchitta. 2006. The DRiP hypothesis decennial: support, controversy, refinement and extension. *Trends Immunol.* 27: 368-373.
27. Yewdell, J. W., E. Reits, and J. Neefjes. 2003. Making sense of mass destruction: quantitating MHC class I antigen presentation. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 952-961.
28. Princiotta, M. F., U. Schubert, W. Chen, J. R. Bennink, J. Myung, C. M. Crews, and J. W. Yewdell. 2001. Cells adapted to the proteasome inhibitor 4-hydroxy- 5-iodo-3-nitrophenylacetyl-Leu-Leu-leucinal-vinyl sulfone require enzymatically active proteasomes for continued survival. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* 98: 513-518.
29. Vos, J. C., P. Spee, F. Momburg, and J. Neefjes. 1999. Membrane topology and dimerization of the two subunits of the transporter associated with antigen processing reveal a three-domain structure. *J Immunol* 163: 6679-6685.
30. Momburg, F., J. Roelse, J. C. Howard, G. W. Butcher, G. J. Hammerling, and J. J. Neefjes. 1994. Selectivity of MHC-encoded peptide transporters from human, mouse and rat. *Nature* 367: 648-651.
31. Neefjes, J., E. Gottfried, J. Roelse, M. Grommé, R. Obst, G. J. Hämmerling, and F. Momburg. 1995. Analysis of the fine specificity of rat, mouse and human TAP peptide transporters. *Eur. J. Immunol.* 25: 1133-1136.
32. Vassilakos, A., M. F. Cohen-Doyle, P. A. Peterson, M. R. Jackson, and D. B. Williams. 1996. The molecular chaperone calnexin facilitates folding and assembly of class I histocompatibility molecules. *EMBO J* 15: 1495-1506.
33. Solheim, J. C., M. R. Harris, C. S. Kindle, and T. H. Hansen. 1997. Prominence of beta(2)-microglobulin, class I heavy chain conformation, and tapasin in the interactions of class I heavy chain with calreticulin and the transporter associated antigen processing. *Journal of Immunology* 158: 2236-2241.
34. Lindquist, J. A., G. J. Hammerling, and J. Trowsdale. 2001. ER60/ERp57 forms disulfide-bonded intermediates with MHC class I heavy chain. *FASEB J* 15: 1448-1450.
35. Park, B., S. Lee, E. Kim, K. Cho, S. R. Riddell, S. Cho, and K. Ahn. 2006. Redox regulation facilitates optimal peptide selection by MHC class I during antigen processing. *Cell* 127: 369-382.
36. Sadasivan, B., P. J. Lehner, B. Ortmann, T. Spies, and P. Cresswell. 1996. Roles for calreticulin and a novel glycoprotein, tapasin, in the interaction of MHC class I molecules with TAP. *Immunity* 5: 103-114.
37. Shastri, N., S. Schwab, and T. Serwold. 2002. Producing nature's gene-chips: the generation of peptides for display by MHC class I molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 20: 463-493.

38. Cascio, P., C. Hilton, A. F. Kisselev, K. L. Rock, and A. L. Goldberg. 2001. 26S proteasomes and immunoproteasomes produce mainly N-extended versions of an antigenic peptide. *EMBO J.* 20: 2357-2366.
39. Powis, S. J., L. L. Young, E. Joly, P. J. Barker, L. Richardson, R. P. Brandt, C. J. Melief, J. C. Howard, and G. W. Butcher. 1996. The rat *cim* effect: TAP allele-dependent changes in a class I MHC anchor motif and evidence against C-terminal trimming of peptides in the ER. *Immunity* 4: 159-165.
40. Serwold, T., F. González, J. Kim, R. Jacob, and N. Shastri. 2002. ERAAP customizes peptides for MHC class I molecules in the endoplasmic reticulum. *Nature* 419: 480-483.
41. Saric, T., S. C. Chang, A. Hattori, I. A. York, S. Markant, K. L. Rock, M. Tsujimoto, and A. L. Goldberg. 2002. An IFN- $\gamma$ -induced aminopeptidase in the ER, ERAP1, trims precursors to MHC class I-presented peptides. *Nat. Immunol.* 3: 1169-1176.
42. York, I. A., S. C. Chang, T. Saric, J. A. Keys, J. M. Favreau, A. L. Goldberg, and K. L. Rock. 2002. The ER aminopeptidase ERAP1 enhances or limits antigen presentation by trimming epitopes to 8-9 residues. *Nat. Immunol.* 3: 1177-1184.
43. Saveanu, L., O. Carroll, V. Lindo, M. Del Val, D. López, Y. Lepelletier, F. Greer, L. Schomburg, D. Fruci, G. Niedermann, and P. M. van Endert. 2005. Concerted peptide trimming by human ERAP1 and ERAP2 aminopeptidase complexes in the endoplasmic reticulum. *Nat. Immunol.* 6: 689-697.
44. Barrett, A. J., Rawlings, N. D., and Woessner, J. F. Handbook of Proteolytic Enzymes. 1998. Academic Press.
45. Hammer, G. E., F. Gonzalez, E. James, H. Nolla, and N. Shastri. 2006. In the absence of aminopeptidase ERAAP, MHC class I molecules present many unstable and highly immunogenic peptides. *Nat. Immunol.* 8:21-22.
46. Tanioka, T., A. Hattori, S. Masuda, Y. Nomura, H. Nakayama, S. Mizutani, and M. Tsujimoto. 2003. Human leukocyte-derived arginine aminopeptidase - The third member of the oxytocinase subfamily of aminopeptidases. *J. Biol. Chem.* 278: 32275-32283.
47. Chang, S. C., F. Momburg, N. Bhutani, and A. L. Goldberg. 2005. The ER aminopeptidase, ERAP1, trims precursors to lengths of MHC class I peptides by a "molecular ruler" mechanism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102: 17107-17112.
48. Evnouchidou, I., F. Momburg, A. Papakyriakou, A. Chroni, L. Leondiadis, S. C. Chang, A. L. Goldberg, and E. Stratikos. 2008. The internal sequence of the peptide-substrate determines its N-terminus trimming by ERAP1. *PLoS. ONE.* 3: e3658.
49. Kanaseki, T., N. Blanchard, G. E. Hammer, F. Gonzalez, and N. Shastri. 2006. ERAAP synergizes with MHC class I molecules to make the final cut in the antigenic peptide precursors in the endoplasmic reticulum. *Immunity.* 25: 795-806.

50. Samino, Y., D. López, S. Guil, L. Saveanu, P. M. van Endert, and M. Del Val. 2006. A long N-terminal-extended nested set of abundant and antigenic major histocompatibility complex class I natural ligands from HIV envelope protein. *J. Biol. Chem.* 281: 6358-6365.
51. Corr, M., L. F. Boyd, S. R. Frankel, S. Kozlowski, E. A. Padlan, and D. H. Margulies. 1992. Endogenous peptides of a soluble major histocompatibility complex class I molecule, H-2L<sup>ds</sup>: sequence motif, quantitative binding, and molecular modeling of the complex. *J. Exp. Med.* 176: 1681-1692.
52. Li, H., K. Natarajan, E. L. Malchiodi, D. H. Margulies, and R. A. Mariuzza. 1998. Three-dimensional structure of H-2Dd complexed with an immunodominant peptide from human immunodeficiency virus envelope glycoprotein 120. *J. Mol. Biol.* 283: 179-191.
53. Achour, A., K. Persson, R. A. Harris, J. Sundback, C. L. Sentman, Y. Lindqvist, G. Schneider, and K. Karre. 1998. The crystal structure of H-2D<sup>d</sup> MHC class I complexed with the HIV-1-derived peptide P18-I10 at 2.4 Angstrom resolution: implications for T cell and NK cell recognition. *Immunity* 9: 199-208.
54. Collins, P. L., R. M. Chanock, and B. R. Murphy. 2007. Respiratory Syncytial Virus. In *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, ed., pp. 1443-1486.
55. Blount, R. E., Jr., J. A. Morris, and R. E. Savage. 1956. Recovery of cytopathogenic agent from chimpanzees with coryza. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med* 92: 544-549.
56. Brandenburg, A. H., H. J. Neijens, and A. D. Osterhaus. 2001. Pathogenesis of RSV lower respiratory tract infection: implications for vaccine development. *Vaccine* 19: 2769-2782.
57. Martinez, F. D. 2003. Respiratory syncytial virus bronchiolitis and the pathogenesis of childhood asthma. *Pediatr Infect. Dis J* 22: S76-S82.
58. Collins, C. L. and A. J. Pollard. 2002. Respiratory syncytial virus infections in children and adults. *J. Infect.* 45: 10-17.
59. Johnson, S., C. Oliver, G. A. Prince, V. G. Hemming, D. S. Pfarr, S. C. Wang, M. Dormitzer, J. O'Grady, S. Koenig, J. K. Tamura, R. Woods, G. Bansal, D. Couchenour, E. Tsao, W. C. Hall, and J. F. Young. 1997. Development of a humanized monoclonal antibody (MEDI-493) with potent *in vitro* and *in vivo* activity against respiratory syncytial virus. *J. Infect. Dis.* 176: 1215-1224.
60. Norrby, E., H. Marusyk, and C. Orvell. 1970. Morphogenesis of respiratory syncytial virus in a green monkey kidney cell line (Vero). *J Virol* 6: 237-242.
61. Garcia, J., B. Garcia-Barreno, A. Vivo, and J. A. Melero. 1993. Cytoplasmic inclusions of respiratory syncytial virus-infected cells: formation of inclusion bodies in transfected cells that coexpress the nucleoprotein, the phosphoprotein, and the 22K protein. *Virology* 195: 243-247.

62. Villanueva, N., J. Navarro, E. Mendez, and I. Garcia-Albert. 1994. Identification of a protein kinase involved in the phosphorylation of the C-terminal region of human respiratory syncytial virus P protein. *J Gen Virol* 75 ( Pt 3): 555-565.
63. Stec, D. S., M. G. Hill, III, and P. L. Collins. 1991. Sequence analysis of the polymerase L gene of human respiratory syncytial virus and predicted phylogeny of nonsegmented negative-strand viruses. *Virology* 183: 273-287.
64. Bermingham, A. and P. L. Collins. 1999. The M2-2 protein of human respiratory syncytial virus is a regulatory factor involved in the balance between RNA replication and transcription. *Proc. Natl Acad. Sci U. S. A* 96: 11259-11264.
65. Whitehead, S. S., A. Bukreyev, M. N. Teng, C. Y. Firestone, M. St Claire, W. R. Elkins, P. L. Collins, and B. R. Murphy. 1999. Recombinant respiratory syncytial virus bearing a deletion of either the NS2 or SH gene is attenuated in chimpanzees. *J Virol* 73: 3438-3442.
66. Heminway, B. R., Y. Yu, and M. S. Galinski. 1994. Paramyxovirus mediated cell fusion requires co-expression of both the fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins. *Virus Res* 31: 1-16.
67. Perez, M., B. Garcia-Barreno, J. A. Melero, L. Carrasco, and R. Guinea. 1997. Membrane permeability changes induced in *Escherichia coli* by the SH protein of human respiratory syncytial virus. *Virology* 235: 342-351.
68. Hendricks, D. A., K. McIntosh, and J. L. Patterson. 1988. Further characterization of the soluble form of the G glycoprotein of respiratory syncytial virus. *J Virol* 62: 2228-2233.
69. Martinez, I. and J. A. Melero. 2000. Binding of human respiratory syncytial virus to cells: implication of sulfated cell surface proteoglycans. *J Gen Virol.* 81: 2715-2722.
70. Collins, P. L. and G. Mottet. 1991. Post-translational processing and oligomerization of the fusion glycoprotein of human respiratory syncytial virus. *J. Gen. Virol.* 72 ( Pt 12): 3095-3101.
71. Anderson, L. J. and C. A. Heilman. 1995. Protective and disease-enhancing immune responses to respiratory syncytial virus. *J Infect. Dis.* 171: 1-7.
72. Kulkarni, A. B., H. C. Morse, J. R. Bennink, J. W. Yewdell, and B. R. Murphy. 1993. Immunization of mice with vaccinia virus-M2 recombinant induces epitope-specific and cross-reactive K<sup>d</sup>-restricted CD8<sup>+</sup> cytotoxic T cells. *J. Virol.* 67: 4086-4092.
73. Openshaw, P. J., K. Anderson, G. W. Wertz, and B. A. Askonas. 1990. The 22,000-kilodalton protein of respiratory syncytial virus is a major target for Kd-restricted cytotoxic T lymphocytes from mice primed by infection. *J Virol.* 64: 1683-1689.
74. Kulkarni, A. B., P. L. Collins, I. Bacik, J. W. Yewdell, J. R. Bennink, J. E. Crowe, Jr., and B. R. Murphy. 1995. Cytotoxic T cells specific for a single peptide on the M2 protein of respiratory syncytial virus are the sole mediators of resistance induced by immunization with M2 encoded by a recombinant vaccinia virus. *J. Virol.* 69: 1261-1264.



75. Graham, B. S., L. A. Bunton, P. F. Wright, and D. T. Karzon. 1991. Role of T lymphocyte subsets in the pathogenesis of primary infection and rechallenge with respiratory syncytial virus in mice. *J. Clin. Invest.* 88: 1026-1033.
76. Chiba, Y., Y. Higashidate, K. Suga, K. Honjo, H. Tsutsumi, and P. L. Ogra. 1989. Development of cell-mediated cytotoxic immunity to respiratory syncytial virus in human infants following naturally acquired infection. *J Med Virol.* 28: 133-139.
77. Isaacs, D., C. R. Bangham, and A. J. McMichael. 1987. Cell-mediated cytotoxic response to respiratory syncytial virus in infants with bronchiolitis. *Lancet* 2: 769-771.
78. Connors, M., A. B. Kulkarni, P. L. Collins, C. Y. Firestone, K. L. Holmes, H. C. Morse, III, and B. R. Murphy. 1992. Resistance to respiratory syncytial virus (RSV) challenge induced by infection with a vaccinia virus recombinant expressing the RSV M2 protein (Vac-M2) is mediated by CD8<sup>+</sup> T cells, while that induced by Vac-F or Vac-G recombinants is mediated by antibodies. *J Virol.* 66: 1277-1281.
79. Connors, M., P. L. Collins, C. Y. Firestone, and B. R. Murphy. 1991. Respiratory syncytial virus (RSV) F, G, M2 (22K), and N proteins each induce resistance to RSV challenge, but resistance induced by M2 and N proteins is relatively short-lived. *J Virol.* 65: 1634-1637.
80. Cherrie, A. H., K. Anderson, G. W. Wertz, and P. J. Openshaw. 1992. Human cytotoxic T cells stimulated by antigen on dendritic cells recognize the N, SH, F, M, 22K, and 1b proteins of respiratory syncytial virus. *J Virol.* 66: 2102-2110.
81. Rock, M. T. and J. E. Crowe. 2003. Identification of a novel human leucocyte antigen-A\*01-restricted cytotoxic T-lymphocyte epitope in the respiratory syncytial virus fusion protein. *Immunology* 108: 474-480.
82. Brandenburg, A. H., L. de Waal, H. H. Timmerman, P. Hoogerhout, R. L. de Swart, and A. D. Osterhaus. 2000. HLA class I-restricted cytotoxic T-cell epitopes of the respiratory syncytial virus fusion protein. *J Virol* 74: 10240-10244.
83. Hsu, S. C., D. M. Shaw, and M. W. Steward. 1995. The induction of respiratory syncytial virus-specific cytotoxic T-cell responses following immunization with a synthetic peptide containing a fusion peptide linked to a cytotoxic T lymphocyte epitope. *Immunology* 85: 347-350.
84. Meiring, H. D., E. C. Soethout, M. C. Poelen, D. Mooibroek, R. Hoogerbrugge, H. Timmermans, C. J. Boog, A. J. Heck, A. P. de Jong, and C. A. van Els. 2006. Stable isotope tagging of epitopes: a highly selective strategy for the identification of major histocompatibility complex class I-associated peptides induced upon viral infection. *Mol. Cell Proteomics.* 5: 902-913.
85. Heidema, J., G. J. de Bree, P. M. De Graaff, W. W. van Maren, P. Hoogerhout, T. A. Out, J. L. Kimpen, and G. M. Van Bleek. 2004. Human CD8(+) T cell responses against five newly identified respiratory syncytial virus-derived epitopes. *J. Gen. Virol.* 85: 2365-2374.



86. Calvo, V., S. Rojo, D. Lopez, B. Galocha, and d. C. J. Lopez. 1990. Structure and diversity of HLA-B27-specific T cell epitopes. Analysis with site-directed mutants mimicking HLA-B27 subtype polymorphism. *J. Immunol.* 144: 4038-4045.
87. Storkus, W. J., D. N. Howell, R. D. Salter, J. R. Dawson, and P. Cresswell. 1987. NK susceptibility varies inversely with target cell class I HLA antigen expression. *J. Immunol.* 138: 1657-1659.
88. Zemmour, J., A. M. Little, D. J. Schendel, and P. Parham. 1992. The HLA-A,B "negative" mutant cell line C1R expresses a novel HLA-B35 allele, which also has a point mutation in the translation initiation codon. *J Immunol.* 148: 1941-1948.
89. Crumacker, D. B., J. Alexander, P. Cresswell, and V. H. Engelhard. 1992. Role of endogenous peptides in murine allogeneic cytotoxic T cell responses assessed using transfectants of the antigen-processing mutant 174xCEM.T2. *J. Immunol.* 148: 3004-3011.
90. Ljunggren, H. G. and K. Karre. 1985. Host resistance directed selectively against H-2-deficient lymphoma variants. Analysis of the mechanism. *J. Exp. Med.* 162: 1745-1759.
91. Anderson, K. S., J. Alexander, M. Wei, and P. Cresswell. 1993. Intracellular transport of class I MHC molecules in antigen processing mutant cell lines. *J Immunol.* 151: 3407-3419.
92. Villadangos, J. A., B. Galocha, and J. A. Lopez de Castro. 1994. Unusual topology of an HLA-B27 allospecific T cell epitope lacking peptide specificity. *J. Immunol.* 152: 2317-2323.
93. Kubo, H., Y. Ikeda-Moore, A. Kikuchi, K. Miwa, K. Nokiara, C. Schonbach, and M. Takiguchi. 1998. Residue 116 determines the C-terminal anchor residue of HLA- B\*3501 and - B\*5101 binding peptides but does not explain the general affinity difference. *Immunogenetics* 47: 256-263.
94. Rajagopalan, S. and E. O. Long. 1997. The direct binding of a p58 killer cell inhibitory receptor to human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-Cw4 exhibits peptide selectivity. *J Exp. Med* 185: 1523-1528.
95. Ozato, K., N. M. Mayer, and D. H. Sachs. 1982. Monoclonal antibodies to mouse major histocompatibility complex antigens. *Transplantation* 34: 113-120.
96. Ozato, K., T. H. Hansen, and D. H. Sachs. 1980. Monoclonal antibodies to mouse MHC antigens. II. Antibodies to the H-2L<sup>d</sup> antigen, the products of a third polymorphic locus of the mouse major histocompatibility complex. *J. Immunol.* 125: 2473-2477.
97. BarnsTabla, C. J., W. F. Bodmer, G. Brown, G. Galfre, C. Milstein, A. F. Williams, and A. Ziegler. 1978. Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens-new tools for genetic analysis. *Cell* 14: 9-20.
98. Parham, P. and W. F. Bodmer. 1978. Monoclonal antibody to a human histocompatibility alloantigen, HLA-A2. *Nature* 276: 397-399.

99. Ellis, S. A., C. Taylor, and A. McMichael. 1982. Recognition of HLA-B27 and related antigen by a monoclonal antibody. *Hum. Immunol.* 5: 49-59.
100. Hunt, D. F., R. A. Henderson, J. Shabanowitz, K. Sakaguchi, H. Michel, N. Sevilir, A. L. Cox, E. Appella, and V. H. Engelhard. 1992. Characterization of peptides bound to the class I MHC molecule HLA-A2.1 by mass spectrometry. *Science* 255: 1261-1263.
101. Wang, M., K. Lamberth, M. Harndahl, G. Roder, A. Stryhn, M. V. Larsen, M. Nielsen, C. Lundegaard, S. T. Tang, M. H. Dziegiel, J. Rosenkvist, A. E. Pedersen, S. Buus, M. H. Claesson, and O. Lund. 2007. CTL epitopes for influenza A including the H5N1 bird flu; genome-, pathogen-, and HLA-wide screening. *Vaccine* 25: 2823-2831.
102. Burrows, S. R., J. Gardner, R. Khanna, T. Steward, D. J. Moss, S. Rodda, and A. Suhrbier. 1994. Five new cytotoxic T cell epitopes identified within Epstein-Barr virus nuclear antigen 3. *J Gen Virol* 75 ( Pt 9): 2489-2493.
103. Fan, Q. R., D. N. Garboczi, C. C. Winter, N. Wagtmann, E. O. Long, and D. C. Wiley. 1996. Direct binding of a soluble natural killer cell inhibitory receptor to a soluble human leukocyte antigen-CW4 class I Major Histocompatibility Complex molecule. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93: 7178-7183.
104. Altman, J. D., P. A. Moss, P. J. Goulder, D. H. Barouch, M. G. McHeyzer-Williams, J. I. Bell, A. J. McMichael, and M. M. Davis. 1996. Phenotypic analysis of antigen-specific T lymphocytes. *Science* 274: 94-96.
105. Cragnolini, J. J. and J. A. Lopez de Castro. 2008. Identification of endogenously presented peptides from Chlamydia trachomatis with high homology to human proteins and to a natural selfligand of HLA-B27. *Mol. Cell Proteomics.* 7: 170-180.
106. Cragnolini, J. J., N. Garcia-Medel, and J. A. Lopez de Castro. 2009. Endogenous processing and presentation of T-cell Epitopes from chlamydia trachomatis with relevance in HLA-B27-associated reactive arthritis. *Mol. Cell Proteomics.* 8: 1850-1859.
107. López, D., O. Calero, M. Jiménez, M. García-Calvo, and M. Del Val. 2006. Antigen processing of a short viral antigen by proteasomes. *J. Biol. Chem.* 281: 30315-30318.
108. Ishihama, Y., J. Rappsilber, J. S. Andersen, and M. Mann. 2002. Microcolumns with self-assembled particle frits for proteomics. *J Chromatogr. A* 979: 233-239.
109. Beer, I., E. Barnea, T. Ziv, and A. Admon. 2004. Improving large-scale proteomics by clustering of mass spectrometry data. *Proteomics* 4: 950-960.
110. Perkins, D. N., D. J. Pappin, D. M. Creasy, and J. S. Cottrell. 1999. Probability-based protein identification by searching sequence databases using mass spectrometry data. *Electrophoresis* 20: 3551-3567.

111. Eng, J., A. McCormack, and J. Yates. 2009. An approach to correlate tandem mass spectral data of peptides with amino acid sequences in a protein database. *J. Amer. Soc. Mass. Spect.* 5: 976-989.
112. Gordon, J. C., J. B. Myers, T. Folta, V. Shoja, L. S. Heath, and A. Onufriev. 2005. H++: a server for estimating pKas and adding missing hydrogens to macromolecules. *Nucleic Acids Res* 33: W368-W371.
113. Anandakrishnan, R. and A. Onufriev. 2008. Analysis of basic clustering algorithms for numerical estimation of statistical averages in biomolecules. *J Comput. Biol.* 15: 165-184.
114. Duan, Y., C. Wu, S. Chowdhury, M. C. Lee, G. Xiong, W. Zhang, R. Yang, P. Cieplak, R. Luo, T. Lee, J. Caldwell, J. Wang, and P. Kollman. 2003. A point-charge force field for molecular mechanics simulations of proteins based on condensed-phase quantum mechanical calculations. *J Comput. Chem.* 24: 1999-2012.
115. Jorgensen WL, J. Chandrasekhar, Madura JD, Impey RW, and M. L. Klein. 1983. Comparison of simple potential functions for simulating liquid water. *J. Chem. Phys.* 79: 926-935.
116. Still, W., Clark, A. Tempczyk, R. C. Hawley, and T. Y. Hendrickson. 1990. Semianalytical treatment of solvation for molecular mechanics and dynamics. *J. Am. Chem. Soc.* 112: 6127-6129.
117. Weiser, J., P. S. Shenkin, and W. C. Still. 2009. Approximate atomic surfaces from linear combinations of pairwise overlaps (LCPO). *J. Com. Chem.* 20: 217-230.
118. Bangham, C. R. and A. J. McMichael. 1986. Specific human cytotoxic T cells recognize B-cell lines persistently infected with respiratory syncytial virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 83: 9183-9187.
119. Rammensee, H. G., J. Bachmann, N. P. N. Emmerich, O. A. Bachor, and S. Stevanovic. 1999. SYFPEITHI: database for MHC ligands and peptide motifs. *Immunogenetics* 50: 213-219.
120. Lopez de Castro, J. A., I. Alvarez, M. Marcilla, A. Paradela, M. Ramos, L. Sesma, and M. Vazquez. 2004. HLA-B27: a registry of constitutive peptide ligands. *Tissue Antigens* 63: 424-445.
121. Falk, K., O. Rotzschke, B. Grahovac, D. Schendel, S. Stevanovic, V. Gnau, G. Jung, J. L. Strominger, and H. G. Rammensee. 1993. Allele-specific peptide ligand motifs of HLA-C molecules. *Proc. Natl Acad. Sci U. S. A* 90: 12005-12009.
122. Buchsbaum, S., E. Barnea, L. Dassau, I. Beer, E. Milner, and A. Admon. 2003. Large-scale analysis of HLA peptides presented by HLA-Cw4. *Immunogenetics* 55: 172-176.
123. Rutigliano, J. A., M. T. Rock, A. K. Johnson, J. E. Crowe, Jr., and B. S. Graham. 2005. Identification of an H-2D(b)-restricted CD8+ cytotoxic T lymphocyte epitope in the matrix protein of respiratory syncytial virus. *Virology* 337: 335-343.

124. Fan, Q. R. and D. C. Wiley. 1999. Structure of human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-Cw4, a ligand for the KIR2D natural killer cell inhibitory receptor. *J Exp. Med* 190: 113-123.
125. Serwold, T., S. Gaw, and N. Shastri. 2001. ER aminopeptidases generate a unique pool of peptides for MHC class I molecules. *Nat. Immunol.* 2: 644-651.
126. Brouwenstijn, N., T. Serwold, and N. Shastri. 2001. MHC class I molecules can direct proteolytic cleavage of antigenic precursors in the endoplasmic reticulum. *Immunity* 15: 95-104.
127. Komlosh, A., F. Momburg, T. Weinschenk, N. Emmerich, H. Schild, E. Nadav, I. Shaked, and Y. Reiss. 2001. A role for a novel luminal endoplasmic reticulum aminopeptidase in final trimming of 26 S proteasome-generated major histocompatibility complex class I antigenic peptides. *J. Biol. Chem.* 276: 30050-30056.
128. Fruci, D., G. Niedermann, R. H. Butler, and P. M. van Endert. 2001. Efficient MHC class I-independent amino-terminal trimming of epitope precursor peptides in the endoplasmic reticulum. *Immunity* 15: 467-476.
129. Samino, Y., D. López, S. Guil, P. de León, and M. Del Val. 2004. An endogenous HIV envelope-derived peptide without the terminal NH<sub>3</sub><sup>+</sup> group is physiologically presented by major histocompatibility class I molecules. *J. Biol. Chem.* 279: 1151-1160.
130. Garcia, A. M., V. F. Ortiz-Navarrete, M. L. Mora-Garcia, F. Flores-Borja, A. Diaz-Quinonez, A. Isibasi-Araujo, C. Trejo-Becerril, R. Chacon-Salinas, J. Hernandez-Montes, J. Granados-Arreola, C. de Leo, and B. Weiss-Steider. 1999. Identification of peptides presented by HLA class I molecules on cervical cancer cells with HPV-18 infection. *Immunol. Lett.* 67: 167-177.
131. Johnson, R. P., A. Trocha, T. M. Buchanan, and B. D. Walker. 1993. Recognition of a highly conserved region of human immunodeficiency virus type 1 gp120 by an HLA-Cw4-restricted cytotoxic T-lymphocyte clone. *J Virol.* 67: 438-445.
132. Stratov, I., C. J. Dale, S. Chea, J. McCluskey, and S. J. Kent. 2005. Induction of T-cell immunity to antiretroviral drug-resistant human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 79: 7728-7737.
133. Hickman-Miller, H. D., W. Bardet, A. Gilb, A. D. Luis, K. W. Jackson, D. I. Watkins, and W. H. Hildebrand. 2005. Rhesus macaque MHC class I molecules present HLA-B-like peptides. *J Immunol.* 175: 367-375.
134. Cooper, S., H. Kowalski, A. L. Erickson, K. Arnett, A. M. Little, C. M. Walker, and P. Parham. 1996. The presentation of a hepatitis C viral peptide by distinct major histocompatibility complex class I allotypes from two chimpanzee species. *J Exp. Med* 183: 663-668.
135. Allen, T. M., J. Sidney, M. F. Del Guercio, R. L. Glickman, G. L. Lensmeyer, Wiebe, DA, R. DeMars, C. D. Pauza, R. P. Johnson, A. Sette, and D. I. Watkins. 1998. Characterization of the peptide binding motif of a rhesus MHC class I molecule (Mamu-A\*01) that binds an immunodominant CTL epitope from simian immunodeficiency virus. *Journal of Immunology* 160: 6062-6071.

136. Yagüe, J., A. Marina, J. Vázquez, and J. A. López de Castro. 2001. Major histocompatibility complex class I molecules bind natural peptide ligands lacking the amino-terminal binding residue in vivo. *J. Biol. Chem.* 276: 43699-43707.
137. Wahl, A., F. Schafer, W. Bardet, R. Buchli, G. M. Air, and W. H. Hildebrand. 2009. HLA class I molecules consistently present internal influenza epitopes. *Proc. Natl Acad. Sci U. S. A* 106: 540-545.
138. Peters, B., J. Sidney, P. Bourne, H. H. Bui, S. Buus, G. Doh, W. Fleri, M. Kronenberg, R. Kubo, O. Lund, D. Nemazee, J. V. Ponomarenko, M. Sathiamurthy, S. Schoenberger, S. Stewart, P. Surko, S. Way, S. Wilson, and A. Sette. 2005. The immune epitope database and analysis resource: from vision to blueprint. *PLoS. Biol.* 3: e91.
139. Jungblut, P. R. 2001. Proteome analysis of bacterial pathogens. *Microbes. Infect.* 3: 831-840.
140. O'Farrell, P. H. 1975. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *J Biol. Chem.* 250: 4007-4021.
141. York, I. A. and K. L. Rock. 1996. Antigen processing and presentation by the class I major histocompatibility complex. *Annu. Rev Immunol.* 14: 369-396.
142. McMurtrey, C. P., A. Lelic, P. Piazza, A. K. Chakrabarti, E. J. Yablonsky, A. Wahl, W. Bardet, A. Eckerd, R. L. Cook, R. Hess, R. Buchli, M. Loeb, C. R. Rinaldo, J. Bramson, and W. H. Hildebrand. 2008. Epitope discovery in West Nile virus infection: Identification and immune recognition of viral epitopes. *Proc. Natl Acad. Sci U. S. A* 105: 2981-2986.

*PUBLICACIONES*

***Publicaciones generadas durante el periodo de elaboración de esta Tesis***

**TLR4-independent upregulation of activation markers in mouse B lymphocytes infected by HRSV**

Rico MA, **Infantes S**, Ramos M, Trento A, Johnstone C, Melero JA, Del Val M, López D

*Molecular Immunology* **2010** May; 47(9):1802-7

**Multiple, non-conserved, internal viral ligands naturally presented by HLA-B27 in human respiratory syncytial virus-infected cells**

**Infantes S**, Lorente E, Barnea E, Beer I, Cragolini JJ, García R, Lasala F, Jiménez M, Admon A, López D.

*Molecular and Cellular Proteomics* **2010** Jul;9(7):1533-9.

**H-2Ld class I molecule protects an HIV N-extended epitope from in vitro trimming by endoplasmic reticulum aminopeptidase associated with antigen processing**

**Infantes S**, Samino Y, Lorente E, Jiménez M, García R, Del Val M, López D.

*Journal of immunology: Cutting Edge* **2010** Apr 1;184(7):3351-5

**Unusual viral ligand with alternative interactions is presented by HLA-Cw4 in human respiratory syncytial virus-infected cells**

**Infantes S**, Lorente E, Cragolini JJ, Ramos M, García R, Jiménez M, Iborra S, Del Val M, López D.

*Immunology and Cell Biology* **2010** en prensa doi:10.1038/icb.2010.125

**TAP-independent human histocompatibility complex-Cw1 antigen processing of an HIV envelope protein conserved peptide**

Lorente E, **Infantes S**, Barnea E, Beer I, García R, Lasala F, Jiménez M, Admon A, López D.

*AIDS*. **2011** Jan 14;25(2):265-9.